

Ein Beitrag zur fermentativen Oxydation des Morphins

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

überreicht von
Heinz-Günter Schneller
aus Berlin

1964

Ein Beitrag zur fermentativen Oxydation des Morphins

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

überreicht von

Heinz-Günter Schneller

aus Berlin

1964

1. Referent: Priv.-Doz. Dr. K. H. Frömming

2. Referent: Prof. Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 5. 1964

Tag der Promotion: **29. JULI 1964**



A. Einleitung und Problemstellung

B. Allgemeines

1. Allgemeines über die Bedeutung der Pharmazie

2. Die Pharmazie als Wissenschaft und Kunst

3. Die Pharmazie als Beruf

4. Die Pharmazie als soziale Aufgabe

5. Die Pharmazie als

6. Die Pharmazie als

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin angefertigt.

Ich bin Herrn Priv.-Doz. Dr. K.H. Frömming sehr dankbar für die Überlassung des Themas und seine ständige Bereitschaft, anfallende Probleme, die sich bei der Durchführung der Arbeit und beim Literaturstudium ergaben, mit mir zu diskutieren.

Auch sei mir an dieser Stelle erlaubt, besonders Herrn Prof. Dr. G. Schenck nicht nur für sein Interesse an meiner wissenschaftlichen Fortbildung, sondern auch für seine menschliche Wärme zu danken.

7. Die Pharmazie als

8. Die Pharmazie als

9. Die Pharmazie als

10. Die Pharmazie als

11. Die Pharmazie als

12. Die Pharmazie als

13. Die Pharmazie als

14. Die Pharmazie als

15. Die Pharmazie als

16. Die Pharmazie als

17. Die Pharmazie als

18. Die Pharmazie als

19. Die Pharmazie als

20. Die Pharmazie als

21. Die Pharmazie als



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung und Problemstellung	7
B. Allgemeiner Teil	8
I. Abhängigkeit der Niederschlagsbildung in den Systemen Phenoloxydase - Überträger - Morphin von den Reaktionsbedingungen	8
II. Abhängigkeit Niederschlagsbildung/Morphinabnahme	14
III. Die Zusammensetzung der Niederschläge	16
1) System Ferment - p-Cumarsäure - Morphin	16
2) System Ferment - Kaffeesäure - Morphin	24
3) Systeme Ferment - Überträger - 3-Hydroxy-N-methylmorphinan und Ferment - Überträger - Codein	29
4) Systeme Peroxydase/Wasserstoffperoxid - Kaffeesäure - Morphin und Peroxydase/Wasserstoffperoxid - p-Cumarsäure - Morphin	32
C. Beschreibung der Versuche	35
I. Gewinnung der Phenoloxydase und Messung der Aktivität	35
II. Papierchromatographie	36
III. Quantitative Morphinbestimmung	36
IV. Abhängigkeit der Niederschlagsbildung in den Systemen Phenoloxydase - Überträger - Morphin von den Reaktionsbedingungen	36
1) Kaffeesäure als Überträger	36
2) p-Cumarsäure als Überträger	37
V. Abhängigkeit Niederschlagsbildung/Morphinabnahme	38
VI. Zusammensetzung der Niederschläge	39
1) Herstellung der Niederschläge	39
2) Aminosäurenachweis	40
3) Alkaloidnachweise	41
a) Säurebehandlung des Morphins	41
b) Vorbehandlung der Niederschläge	41

	Seite
c) Alkaloidanreicherung	41
d) Identifizierung des Morphins	42
e) Identifizierung des Pseudomorphins	43
aa) Spektrophotometrischer Nachweis	43
bb) Isolierung des Pseudomorphins	45
f) Nichtfermentative Herstellung von Pseudomorphin als Vergleichspräparat	47
g) Quantitative Morphinbestimmung im System Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin und Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin	48
4) Untersuchung der Beteiligung von Kaffeesäureoxydationsprodukten an der Niederschlagsbildung des Systems Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin	49
VII. Systeme Ferment - Überträger - 3-Hydroxy-N-methylmorphinan (Dromoran®) und Ferment - Überträger - Codein	50
VIII. Beschreibung der Peroxydase und Bestimmung der Aktivität	51
IX. Wasserstoffperoxid	52
X. Untersuchung der Systeme Peroxydase/Wasserstoffperoxid - Kaffeesäure - Morphin und Peroxydase/Wasserstoffperoxid - p-Cumarsäure - Morphin	52
1) Kaffeesäure als Überträger	52
2) p-Cumarsäure als Überträger	53
XI. Beschreibung der aus dem Handel bezogenen Substanzen	54
D. Zusammenfassung und Diskussion	56
E. Literaturverzeichnis	61

A. Einleitung und Problemstellung

Die von verschiedenen Autoren berichteten Morphinabnahmen bei der Opiumgewinnung (z.B. 1, 2, 3, 4, 5) sind auf eine Einwirkung des Oxydationsenzym *Phenoloxydase* auf das Morphin in Gegenwart von 4-Hydroxyzimtsäure (*p*-Cumarsäure) oder 3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeesäure) zurückzuführen (6, 7, 8, 9). H.J. KLUGE hatte gezeigt, daß die *Phenoloxydase* und die beiden Zimtsäurederivate in Mohnkapseln in solchen Konzentrationen vorkommen, daß eine entsprechende Reaktion ablaufen kann.

Nähere Aussagen über den Verlauf der Reaktion konnten bisher nur insoweit gemacht werden, als das Morphin mit den fermentativ gebildeten Reaktionsprodukten der Hydroxyzimtsäurederivate in Reaktion zu treten scheint.

Die vorliegende Arbeit sollte sich mit der weiteren Aufklärung der Reaktion befassen. Hierbei sollten in erster Linie die Bedingungen der Bildung und die Zusammensetzung der Niederschläge untersucht werden, die sich bei der Einwirkung des Ferments auf Morphin in Anwesenheit der Hydroxyzimtsäurederivate bilden, um hieraus einen weiteren Einblick in den Reaktionsablauf zu erhalten.

B. Allgemeiner Teil

Bei der Einwirkung der Phenoloxydase in wässriger Lösung auf p-Cumarsäure oder Kaffeesäure bildet sich nach einer Induktionsperiode (4-Hydroxymzimtsäure) oder sofort nach der Fermentzugabe (3,4-Dihydroxymzimtsäure) eine Verfärbung der Lösung, ohne daß die Bildung eines Niederschlages zu beobachten ist. Bei der Einwirkung des Ferments auf Morphin bleibt die Lösung farblos und klar, da das Alkaloid von dem Ferment nicht angegriffen wird.

Läßt man die Phenoloxydase jedoch in Gegenwart von Kaffeesäure auf Morphin einwirken, so bildet sich nach anfänglicher Braunfärbung der Lösung eine feine Trübung durch kleine Teilchen, die sich bald am Boden des Reaktionsgefäßes absetzen und schließlich einen braun gefärbten Niederschlag bilden. Nach etwa 30 Minuten - die Zeit hängt selbstverständlich von den Reaktionsbedingungen ab - hört die Niederschlagsbildung auf, und die Reaktionslösung wird völlig klar, nachdem sich die **festen** Bestandteile abgesetzt haben.

Bei der Fermenteinwirkung auf eine wässrige Lösung von p-Cumarsäure und Morphin kommt die Reaktion erst nach einer Induktionszeit in Gang, deren Länge von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer abhängt. Die Niederschlagsbildung setzt demzufolge später ein als in dem Ansatz mit Kaffeesäure. Nach einer Reaktionsdauer von etwa 18 Stunden hat sich die überstehende Lösung geklärt, und am Boden des Gefäßes befindet sich ein gelber Niederschlag.

I. Abhängigkeit der Niederschlagsbildung in den Systemen Phenoloxydase - Überträger - Morphin von den Reaktionsbedingungen

Zur Erzielung einer möglichst großen Niederschlagsmenge wurde bei gegebener Konzentration von Kaffeesäure und Morphin die Fermentkonzentration variiert.

Die Reaktionsansätze hatten hierfür folgende Zusammensetzung:

- 60,0 mg Morphin-HCl und
- 60,0 mg Kaffeesäure, gelöst in einer Mischung aus
- 12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10) und
- 12,0 ml destilliertem Wasser
- 6,0 ml Fermentverdünnung verschiedener Konzentration

In Abhängigkeit von der Fermentkonzentration ergaben sich die in Tab. 1 angeführten Niederschlagsmengen.

Fermentkonzentration in 6,0 ml Fermentverdünnung [Cresolase-Einh.]	Niederschlagsmenge [mg]
6,0	7,2
12,0	13,4
18,0	18,1
24,0	25,3
30,0	25,9
36,0	26,3
42,0	24,5
48,0	22,6
54,0	23,0
60,0	22,2

Tab. 1

Die Niederschlagsmenge nimmt bei Verwendung einer Fermentverdünnung von 36,0 Cresolase-Einheiten in 6,0 ml einen maximalen Wert an, um sich dann bei Zugabe stärkerer Konzentrationen nicht mehr wesentlich zu ändern.

Für die weiteren Untersuchungen wurde diese Verdünnung herangezogen.

Um im System Ferment - Kaffeesäure - Morphin die optimale Morphinkonzentration zu bestimmen, die zur Erzielung einer

größtmöglichen Niederschlagsmenge notwendig ist, wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

10,0-100,0 mg Morphin-HCl und

60,0 mg Kaffeesäure, gelöst in einer Mischung aus

12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach

MC ILVAINE (10) und

12,0 ml destilliertem Wasser

6,0 ml Fermentverdünnung mit 36 Cresolase-Einh.

Die hierbei gefundenen Niederschlagsmengen sind in Tab. 2 aufgeführt.

Morphin-HCl in 30,0 ml Lösung [mg]	Niederschlagsmenge [mg]
10,0	0
20,0	0
30,0	0
40,0	7,0
50,0	13,0
60,0	24,6
70,0	34,7
80,0	37,0
90,0	36,2
100,0	38,4

Tab. 2

Die Tabelle zeigt, daß die Niederschlagsbildung zunimmt, bis bei 70,0 mg Morphin-HCl in 30,0 ml Reaktionslösung ein optimaler Wert erreicht ist. Weitere Morphinzugaben steigern die Niederschlagsbildung nur unwesentlich.

Zur Bestimmung optimaler Kaffeesäurekonzentration wurde folgender Ansatz verwendet:

10,0-60,0 mg Kaffeesäure und

100,0 mg Morphin-HCl, gelöst in einer Mischung aus

12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach

MC ILVAINE (10) und

12,0 ml destilliertem Wasser

6,0 ml Fermentverdünnung mit 36 Cresolase-Einh.

Hierbei wurden die in Tab. 3 angegebenen Niederschlagsmengen gefunden.

Kaffeensäure in 30,0 ml Lösung [mg]	Niederschlagsmenge [mg]
10,0	20,7
20,0	27,5
30,0	31,7
40,0	30,4
50,0	30,7
60,0	32,2

Tab. 3

Es zeigt sich, daß bei 30,0 mg Kaffeensäure in 30,0 ml Reaktionslösung die maximale Niederschlagsbildung erreicht wird. Bei weiterem Kaffeensäurezusatz erfolgt keine weitere Steigerung.

Sieht man die Konzentrationen der Reaktionspartner als optimal an, deren geringster Wert eine möglichst große Niederschlagsbildung bedingt, so ergibt sich für 30,0 ml Reaktionsansatz 30,0 mg Kaffeensäure, entsprechend 1,0 mg pro ml Reaktionslösung, und 70,0 mg Morphin-HCl, entsprechend 2,33 mg pro ml Reaktionslösung. Dies entspricht etwa einem Molverhältnis von 1 : 1.

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Niederschlagsbildung von der Morphinkonzentration in dem System Ferment - p-Cumarsäure - Morphin wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

20,0-200,0 mg Morphin-HCl und

60,0 mg p-Cumarsäure, gelöst in einer Mischung aus

12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach

MC ILVAINE (10) und

12,0 ml destilliertem Wasser

6,0 ml Fermentverdünnung mit 36 Cresolase-Einh.

Die Niederschlagsmengen sind in Tab. 4 angegeben.

Morphin-HCl in 30,0 ml Lösung [mg]	Niederschlagsmenge [mg]
20,0	13,2
40,0	18,4
60,0	20,0
80,0	20,9
100,0	21,5
120,0	22,8
140,0	24,6
160,0	24,8
180,0	24,6
200,0	25,8

Tab. 4

Die optimale Morphinkonzentration beginnt bei etwa 140,0 mg Morphin-HCl in 30,0 ml Reaktionslösung, entsprechend 4,7 mg Morphin-HCl pro ml.

Der Reaktionsansatz zur Bestimmung optimaler p-Cumarsäurekonzentration hatte folgende Zusammensetzung:

- 10,0-60,0 mg p-Cumarsäure und
- 140,0 mg Morphin-HCl, gelöst in einer Mischung aus
- 12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
- MC ILVAINE (10) und
- 12,0 ml destilliertem Wasser
- 6,0 ml Fermentverdünnung mit 36 Cresolase-Einh.

Es ergaben sich die in Tab. 5 angegebenen Niederschlagsmengen.

p-Cumarsäure in 30,0 ml Lösung [mg]	Niederschlagsmenge [mg]
10,0	24,3
20,0	29,3
30,0	28,3
40,0	25,5
50,0	23,1
60,0	22,7

Tab. 5

Hier ergibt sich eine optimale p-Cumarsäurekonzentration von 20,0 mg in 30,0 ml Reaktionslösung, entsprechend 0,67 mg p-Cumarsäure pro ml.

Im Gegensatz zur Kaffeesäure als Überträger liegt bei p-Cumarsäure bei maximaler Niederschlagsbildung das Verhältnis der Reaktionspartner bei 20,0 mg p-Cumarsäure zu 140,0 mg Morphin-HCl, entsprechend 0,67 mg p-Cumarsäure zu 4,7 mg Morphin-HCl pro ml. Es kommt etwa 1 Mol p-Cumarsäure auf 3 Mol Morphin-HCl.

II. Abhängigkeit Niederschlagsbildung/Morphinabnahme

Es sollte untersucht werden, ob zwischen der Morphinabnahme in den beiden Systemen und der Niederschlagsbildung ein Zusammenhang besteht, d.h. ob bei großer Niederschlagsmenge auch die Morphinabnahme hoch ist.

Hierzu wurde ein Reaktionsansatz a) mit den optimalen Bedingungen von 30,0 mg Kaffeesäure und 70,0 mg Morphin-HCl einem Reaktionsansatz b) mit 10,0 mg Kaffeesäure und 100,0 mg Morphin-HCl gegenübergestellt. Diese beiden Ansätze unterschieden sich in ihrer Niederschlagsbildung deutlich voneinander. Beim Bestehen eines Zusammenhanges zwischen Morphinabnahme und Niederschlagsbildung mußte im Reaktionsansatz b) eine deutlich geringere Morphinabnahme festzustellen sein.

Die Ergebnisse bestätigten diese Annahme: In dem Ansatz a) mit großer Niederschlagsbildung wurde eine Morphinabnahme von etwa 21% festgestellt, während im Ansatz b) nur eine Abnahme von 13% gefunden wurde (Tab. 6 u. 7).

Extinktionswerte				
vor d. Reaktion 0,08 ml Lösung	Mittelwert E_1	n.d. Reaktion 0,10 ml Lösung	Mittelwert E_2	$(E_1 - E_2) \cdot 10^3$
0,154	0,155	0,123	0,123	32
0,156		0,124		
0,154		0,121		

Tab. 6 (Reaktionsansatz a)

Extinktionswerte				
vor d. Reaktion 0,08 ml Lösung	Mittelwert E_1	n.d. Reaktion 0,10 ml Lösung	Mittelwert E_2	$(E_1 - E_2) \cdot 10^3$
0,221	0,223	0,191	0,194	29
0,226		0,196		
0,222		0,195		

Tab. 7 (Reaktionsansatz b)

Zur Klärung, ob entsprechende Verhältnisse auch in dem System Ferment - p-Cumarsäure - Morphin vorliegen, wurde einem Ansatz a) mit den optimalen Konzentrationen von 20,0 mg p-Cumarsäure und 140,0 mg Morphin-HCl ein Ansatz b) mit 60,0 mg p-Cumarsäure und 140,0 mg Morphin-HCl gegenübergestellt. Auch hier zeigte der Reaktionsansatz mit den optimalen Konzentrationen eine deutlich vermehrte Morphinabnahme (21%) gegenüber dem Vergleichsansatz (8%). (s. Tab. 8 u. 9)

Extinktionswerte				
vor d. Reaktion 0,08 ml Lösung	Mittelwert E_1	n.d.Reaktion 0,10 ml Lösung	Mittelwert E_2	$(E_1 - E_2) \cdot 10^3$
0,297	0,302	0,246	0,238	64
0,306		0,236		
0,304		0,233		

Tab. 8 (Reaktionsansatz a)

Extinktionswerte				
vor d. Reaktion 0,08 ml Lösung	Mittelwert E_1	n.d.Reaktion 0,10 ml Lösung	Mittelwert E_2	$(E_1 - E_2) \cdot 10^3$
0,297	0,296	0,270	0,272	24
0,294		0,272		
0,296		0,274		

Tab. 9 (Reaktionsansatz b)

Es kann aus diesen Versuchen wohl hergeleitet werden, daß in den beiden Systemen ein Zusammenhang zwischen der Menge des gebildeten Niederschlags und der Morphinabnahme besteht. Bei vermehrter Niederschlagsbildung ist auch eine vermehrte Morphinabnahme zu beobachten.

III. Die Zusammensetzung der Niederschläge

1) System Ferment - p-Cumarsäure - Morphin

Die Niederschläge können theoretisch Eiweißbestandteile des Ferments, p-Cumarsäure und deren Oxydationsprodukte sowie Morphin und dessen Oxydationsprodukte enthalten.

Zur Untersuchung, ob das Ferment an der Zusammensetzung des Niederschlages beteiligt ist, wurden der Niederschlag und zum Vergleich das Ferment selbst nach J.E. EASTOE (11) hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden papierchromatographisch auf Aminosäuren untersucht.

Das Ziel war, nicht eine vollkommene Aminosäurenanalyse durchzuführen, sondern es sollte lediglich festgestellt werden, ob im Niederschlag Aminosäuren enthalten sind und ob Identität zwischen den Aminosäuren des Niederschlages und des Ferments besteht.

In beiden Fällen hatten die mit Ninhydrin angefärbten Flecke entsprechende Rf-Werte und zeigten dieselben Farbtöne. Mit Sicherheit traten im eindimensionalen Chromatogramm acht Aminosäureflecke mit den Rf-Werten

0,82; 0,62; 0,47; 0,39; 0,27; 0,23; 0,17; 0,08 auf. Eine Beteiligung des Ferments an der Bildung des Niederschlages im System Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin steht damit außer Zweifel.

Zur Untersuchung, ob im Niederschlag Alkaloide enthalten waren, wurde zunächst eine einfache papierchromatographische Untersuchung durchgeführt, indem eine Suspension von etwa 3 mg ausgewaschenem Niederschlag in 0,1 ml Methanol untersucht wurde. Die Ergebnisse fielen nicht zufriedenstellend aus; es bildete sich beim Entwickeln auf dem Chromatogramm vom Startfleck ab bis Rf 0,63 ein Streifen, der mit Alkaloidreagenz anfärbbar war.

Es war hierbei nicht möglich, irgendwelche Einzelflecke zu lokalisieren, so daß die Notwendigkeit bestand, den

Niederschlag aufzuschließen. Dazu wurde der vom nicht umgesetzten Morphin befreite Niederschlag wie bei der Untersuchung auf Eiweißbestandteile 30 Stunden lang bei 105°C mit 20%iger HCl behandelt. Nach dem Entwickeln und Besprühen mit Alkaloidreagenz zeigte sich auf dem Papierchromatogramm ein grüner Fleck mit Rf 0,70.

Vergleichsuntersuchungen zeigten, daß es sich bei diesem Fleck um ein Umwandlungsprodukt des Morphins handeln mußte. Bei entsprechender Behandlung des Morphins allein wurde auf dem Chromatogramm ein gleicher Fleck erhalten, der im durchscheinenden UV-Licht stark hellblau fluoreszierte; er färbte sich nach dem Besprühen allmählich grün.

Durch Vergleiche wurde papierchromatographisch festgestellt, daß es sich hierbei um Apomorphin handelt. Apomorphin und das nach dem Behandeln mit 20%iger HCl erhaltene Umwandlungsprodukt ergaben mit Phenolreagenz nach O. FOLIN und G. CIOCALTEU (12) gleiche Färbung.

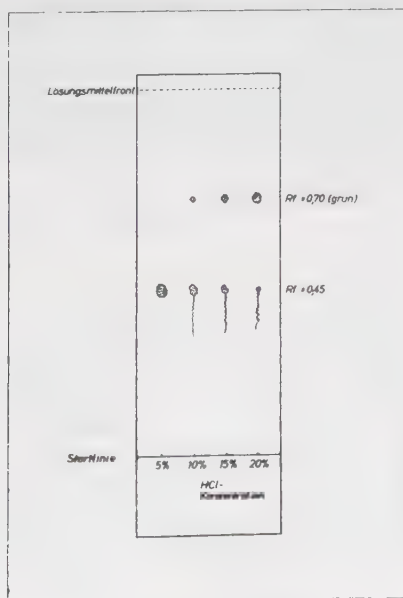


Abb. 1

Es wurde gefunden, daß bei Verwendung von 5%iger Salzsäure eine Umwandlung des Morphins zu Apomorphin nicht mehr erfolgt (Abb. 1).

Diese Ergebnisse führten dazu, die Behandlung mit einer 10%igen Salzsäure durchzuführen, nachdem der Niederschlag vorher in 50%iger Essigsäure gelöst worden war.

Die papierchromatographische Untersuchung zeigte zwei mit Alkaloidreagenz anfärbbare Flecke mit R_f 0,45 und 0,20, wobei jedoch noch eine stärkere streifenförmige, mit Alkaloidreagenz nicht anfärbbare Überlagerung auftrat. Diese rührte wahrscheinlich von Polymerisationsprodukten her. Es mußte daher eine weitergehende Anreicherung der Alkaloide erfolgen, wozu nach Behandlung des Niederschlages mit 5%iger HCl und nach anschließendem Ammoniakalischmachen mit Chloroform/Isopropanol ein Extrakt hergestellt wurde. Dieser ergab ein gelbbraunes Pulver, das nach papierchromatographischer Trennung im durchfallenden kurzwelligen UV-Licht zwei Flecke, einen dunkel erscheinenden mit R_f 0,45 und einen stark leuchtenden mit R_f 0,20 ergab. Beide Flecke zeigten positive Alkaloidreaktion. Sie färbten sich mit den Phenolreagenzien diazotierte Sulfanilsäure (13) und Phosphormolybdänsäurelösung nach O. FOLIN und G. CIICALTEU (12) an.

Der Vergleich mit einer authentischen Probe zeigte, daß es sich bei dem Alkaloid mit dem R_f -Wert 0,45 um Morphin handelt. Dies konnte auch durch das UV-Spektrum bewiesen werden, das von einer papierchromatographisch abgetrennten und extrahierten Probe aufgenommen wurde. Die extrahierte Substanz zeigte ein Maximum bei 286 $m\mu$ (Morphin 287 $m\mu$) und ein Minimum bei 263 $m\mu$ (Morphin 261 $m\mu$) (Abb. 2). Das abgetrennte Alkaloid gab dieselben Tüpfelreaktionen mit den

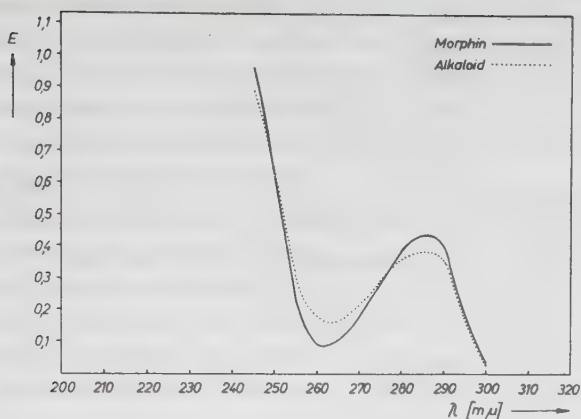
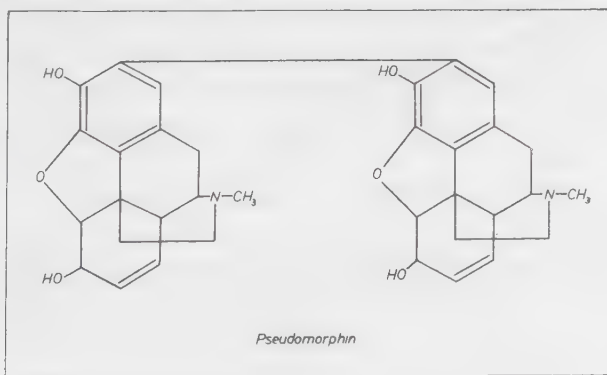


Abb. 2: Spektrum des Alkaloids mit Rf 0,45 aus dem Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin - Niederschlag im Vergleich zu Morphin

Reagenzien nach FROEDE, ERDMANN, MANDELIN und MARQUIS (14) wie authentisches Morphin. Auch eine Mikrofarbreaktion nach YUN-HSIAN YU (15) ergab bereits bei der Prüfung des Niederschlages einen positiven Ausfall. Diese Probe ist spezifisch auf Morphin und läßt es somit zu, Morphin neben anderen Opiumalkaloiden, auch neben dem Oxydationsprodukt Pseudomorphin, zu erkennen.



Die besonders helle Fluoreszenz im UV-Licht und der niedrige Rf-Wert von 0,20 deuteten darauf hin, daß es sich bei diesem Stoff um das 1902 von J. BOUGAULT (16) angeblich gefundene Pseudomorphin handeln könnte, das bei der Einwirkung eines Preßsaftes von Täublingen auf verdünnte alkoholische Morphinlösungen entstanden sein sollte.

Papierchromatographisch zeigte Pseudomorphin das gleiche Verhalten wie das unbekannte Alkaloid im Niederschlagsextrakt. Versuche, das Spektrum dieser Substanz nach Elution aus dem Papier in derselben Weise aufzunehmen, wie es beim Morphin gelang, blieben ohne Erfolg. Durch die kürzerwellige Lage des Pseudomorphin-Maximums machten sich mitextrahierte Papierbestandteile zu störend bemerkbar.

Nachdem das Chromatographierpapier längere Zeit mit Methanol eluiert worden war, gelang jedoch eine zufriedenstellende Abtrennung und Extraktion des Pseudomorphins.

Wie der Vergleich mit authentischer Probe zeigt, ist der Kurvenverlauf des unbekannten Alkaloids mit dem des Pseudomorphins identisch. Die Kurve hat ein Maximum bei 237 m μ (Pseudomorphin 238 m μ), und auch die charakteristische Schulter bei 275 m μ ist vorhanden (Abb. 3).

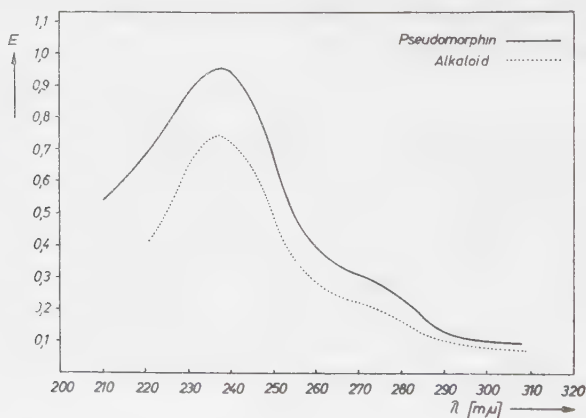


Abb. 3: Spektren des unbekannten Alkaloids (Rf 0,20) und des Pseudomorphins

Es sollte nun versucht werden, dieses wahrscheinlich mit Pseudomorphin identische Alkaloid in kristalliner Form zu erhalten. Die Schwierigkeit lag besonders darin, daß im Niederschlag viel Morphin neben wenig Pseudomorphin vorlag. Auf Grund einer halbquantitativen Schätzung allein durch Vergleich der Fleckengrößen auf dem Papierchromatogramm sollte das Verhältnis etwa bei 50 : 1 liegen.

Es gelang, die Trennung des Pseudomorphins vom Morphin vom Papier auf eine Whatman-1-Zellulosesäule zu übertragen. Als Laufmittel diente wieder das Partridge-Gemisch. Insgesamt wurden 20,0 g p-Cumarsäure und 20,0 g Morphin-HCl verarbeitet. Es konnten 61 mg Pseudomorphin in Form eines bräunlichen, amorphen Produktes isoliert werden, das papierchromatographisch zwar rein und einheitlich war (R_f 0,18), jedoch spektralphotometrisch noch Verunreinigungen vermuten ließ. Das Produkt gab aber schon die für Pseudomorphin typischen Farbreaktionen mit Formaldehyd-Schwefelsäure, konz. Schwefelsäure und Rohrzucker sowie nach entsprechender Vorbehandlung mit konz. Salpetersäure, Natriumnitritlösung und Natriumhypochloritlösung (17).

Die Substanz ließ sich sehr schwer umkristallisieren, sie fiel meist nur in Form bräunlicher Flocken an. Schließlich gelang es, 0,74 mg gelbliche, unter dem Mikroskop als rechteckige Blättchen erscheinende Kristalle zu erhalten. Wegen der geringen Ausbeute mußte von einer Elementaranalyse Abstand genommen werden. Es wurde der molare Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum der getrockneten Substanz bestimmt und das UV-Spektrum in Methanol aufgenommen. Dieses stimmte mit dem eluierten Pseudomorphin überein.

Der molare Extinktionskoeffizient betrug:

$$\epsilon = \frac{E}{c \cdot d} = 39900$$

In der Literatur (18) wird ein Wert von 40040 angegeben. Die getrocknete Substanz zersetzte sich zwischen 330°C und 335°C (Kofler-Heiztischmikroskop). Literatur (19): ca. 327°C (Zers.)

Es sollte versucht werden, das aus dem Niederschlag nach Säureeinwirkung extrahierte Morphin quantitativ zu erfassen, um festzustellen, wie groß der Anteil des im Niederschlag gebundenen Morphins ist. Hierzu mußte die Morphinabnahme in der überstehenden Lösung nach der Einwirkung der Phenoloxydase gemessen werden und anschließend im ausgewaschenen und mit Säure behandelten Niederschlag der Gehalt an Morphin festgestellt werden.

Es erwies sich aber, daß auf diese Weise quantitative Aussagen nicht möglich sind. Bei gleicher Morphinabnahme im Ansatz streuten die extrahierten Morphinmengen sehr. Es ist zu vermuten, daß durch die vielen manuellen Operationen, das häufige Auswaschen des Niederschlages und die Säurebehandlung ein großer Teil des Morphins verlorengeht.

Gleichzeitig sollte diese Untersuchung eine Aussage über die Stärke der Bindung des Morphins an den Niederschlag geben.

Die Methode mußte also möglichst aus wenigen Einzelschritten bestehen, um so im ganzen einfach zu sein. Sie wurde deshalb insofern variiert, als nach dem Säurezusatz auf ein Erhitzen verzichtet wurde und sämtliche Vorgänge in einem Gefäß abliefen. Der Säurezusatz erfolgte statt dessen 48 Stunden lang. Die Meßmethodik lief also darauf hinaus, in dem Ansatz Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin erst die Morphinabnahme zu messen und dann festzustellen, ob bei Säurezusatz der Morphingehalt wieder steigt.

Nach dem Chromatographieren und Eluieren wurden für das Morphin die in Tab. 10 angegebenen Extinktionen gemessen.

	E	Mittelwert E
Morphin vor der Fermentzugabe	0,276	0,276
0,080 ml Reaktionslösung	0,273	
	0,278	
Morphin nach der Fermenteinwirkung	0,245	0,243
0,085 ml Reaktionslösung	0,246	
	0,239	
Morphin nach dem Säurezusatz	0,248	0,247
0,104 ml Reaktionslösung	0,251	
	0,242	

Tab. 10

Tab. 10 zeigt, daß durch die hinzugefügte Säure keine Morphinzunahme in der Lösung erfolgt. Das Morphin scheint also hier in fester Bindung vorzuliegen. Für die sehr säurefeste Bindung spricht auch, daß bei der Chromatographie des Niederschlages vor der Säureeinwirkung im Rf-Bereich von 0,45 kein Alkaloidfleck gefunden werden konnte.

2) System Ferment - Kaffeesäure - Morphin

Da die von E. SCHWALB (7) gemachten Untersuchungen ergeben hatten, daß im Opium nicht nur p-Cumarsäure, sondern auch Kaffeesäure bei der fermentativen Morphinabnahme als Überträger wirken kann, wurde der im System Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin auftretende Niederschlag ebenso wie bei p-Cumarsäure untersucht.

Nach der entsprechenden Hydrolyse des Niederschlages waren mit Sicherheit wieder acht Aminosäureflecke papierchromatographisch nachzuweisen. Die Rf-Werte waren

0,83; 0,61; 0,47; 0,38; 0,27; 0,22; 0,16; 0,09.

Das Ergebnis der Untersuchung war das gleiche wie bei dem Niederschlag, der bei Verwendung von p-Cumarsäure als Überträger auftritt. Demzufolge war auch hier das Ferment an der Niederschlagsbildung beteiligt.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit p-Cumarsäure als Überträger wurde der Niederschlag sofort in 50%iger Essigsäure gelöst. Es wurde also nicht erst mit einer Suspension gearbeitet. Bei der Chromatographie der essigsäuren Lösung trat ein Alkaloidfleck mit Rf 0,45 auf. Da es sich aller Wahrscheinlichkeit nach auch hier um Morphin handelte, lag die Vermutung nahe, daß dies noch nicht restlos ausgewaschenes, nicht umgesetztes Morphin war. Nähere Untersuchungen zeigten, daß dies nicht der Fall war. Es war in dieser Hinsicht also bereits ein wesentlicher Unterschied im Verhalten des Niederschlages in Essigsäure gegenüber dem Verhalten des Niederschlages des Systems Ferment - p-Cumarsäure - Morphin.

Zur Prüfung, ob neben dieser relativ lockeren Adsorption auch Alkaloide ähnlich wie bei p-Cumarsäure fester gebunden waren, wurde der Niederschlag nach derselben Methode mit Salzsäure behandelt. Es zeigte sich zwar eine Vergrößerung des Alkaloidfleckes mit Rf 0,45, andere Alkaloide wurden jedoch nicht gefunden. Auch ein Ansatz, der ebenso lange, d.h. 18 Stunden, wie bei p-Cumarsäure als Überträger behandelt worden war, zeigte dasselbe Ergebnis.

Da auch bei Kaffeesäure als Überträger die auf dem Papierchromatogramm mitwandernden Polymerisationsprodukte eine Isolierung des Alkaloids erschwerten, wurde in der gleichen Weise wie in dem System Ferment - p-Cumarsäure - Morphin das Alkaloid extrahiert. Der Extrakt bestand aus einer hellbraunen, erst sirupartigen, beim Stehenlassen dann fest werdenden Substanz.

Etwa 2 mg Extrakt, in 0,1 ml Methanol gelöst, wurden jeweils papierchromatographisch untersucht. Es zeigte sich, daß nach dem Entwickeln und Trocknen des Chromatogramms im durchscheinenden kurzwelligen UV-Licht ein dunkler Fleck mit R_f 0,45 entstanden war. Mit Alkaloidreagenz besprüht, reagierte er positiv, ebenfalls mit den Phenolreagenzien diazotierte Sulfanilsäure (13) und Phosphormolybdänsäurelösung nach O. FOLIN und G. CIOCALTEU (12). Ein Vergleichschromatogramm mit authentischem Morphin hatte denselben R_f -Wert wie das aus dem Niederschlag extrahierte Alkaloid.

Das UV-Spektrum erwies sich mit dem Spektrum des Morphins als identisch. Es zeigte ein Maximum bei 287 $m\mu$ (Morphin 287 $m\mu$) und ein Minimum bei 263 $m\mu$ (Morphin 261 $m\mu$).

Zur quantitativen Untersuchung der aus dem Niederschlag herauslösbaren Morphinmenge wurde das gleiche Verfahren wie in dem System Ferment - p-Cumarsäure - Morphin angewendet.

	E	Mittelwert E
Morphin vor der Fermentzugabe	0,265	0,263
0,080 ml Reaktionslösung	0,262	
	0,262	
Morphin nach der Fermenteinwirkung	0,194	0,195
0,085 ml Reaktionslösung	0,197	
	0,194	
Morphin nach dem Säurezusatz	0,231	0,232
0,104 ml Reaktionslösung	0,234	
	0,231	

Tab. 11

Die Untersuchung zeigte, daß nach dem Säurezusatz etwa 46% des nach der Fermenteinwirkung verschwundenen Morphins wiedergefunden werden konnten (Tab. 11). Die gefundene Morphinzunahme in der überstehenden Lösung kann nur dadurch erfolgen, daß aus dem Niederschlag das Morphin herausgelöst wurde. Die restliche Morphinmenge muß entweder noch in sehr fester Bindung im Niederschlag sein, oder sie ist oxydiert worden.

Da sich schon beim Chromatographieren des Niederschlages Morphin zeigte, ist das Auftreten durch Säure herausgelösten Morphins durch die lockerere Bindung gegenüber p-Cumarsäure als Überträger zu erklären.

Infolge seiner stark braunen Färbung lag die Vermutung nahe, daß Oxydationsprodukte der Kaffeesäure an der Bildung des Niederschlages beteiligt sind, denn auch reine Kaffeesäurelösungen werden durch Phenoloxydase braun gefärbt. Auch zeigte das Filtrat nach dem Abfiltrieren des Niederschlages eine hellere Färbung als nach der Einwirkung des Ferments auf die gleiche Menge Kaffeesäure allein. Es scheint also, daß eine Polymerisation der Oxydationsprodukte der Kaffeesäure zu dunkel gefärbten Verbindungen in dem System Ferment - Kaffeesäure - Morphin nicht in dem Maße erfolgt wie in dem System Ferment - Kaffeesäure.

Versuche, den Niederschlag unter Verwendung von Reduktionsmitteln aufzuschließen und dann die Kaffeesäure nachzuweisen, mißlingen. Papierchromatographisch war auch nicht die charakteristische Fluoreszenz zu beobachten.

Hieraus muß man den Schluß ziehen, daß bereits eine weitere Umwandlung der Kaffeesäure eingetreten ist, sei es, daß eine Polymerisierung des Oxydationsproduktes der Kaffeesäure erfolgte oder daß eine Bindung zwischen der Chinonkomponente und dem Eiweiß eingetreten ist, wie vielfach in der Literatur beschrieben wird (20, 21, 22).

Um hierfür eine nähere Aussage machen zu können, sollte festgestellt werden, ob die Anwesenheit von Kaffeesäurechinon zur Niederschlagsbildung notwendig ist. Hierzu erfolg-

te der Morphinzusatz zu dem System Ferment - Kaffeesäure in verschiedenen Stadien der fermentativen Kaffeesäureoxydation, d.h. zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Fermentzugabe.

In Vergleichsproben wurde festgestellt, ob zur Zeit des Morphinzusatzes noch nichtoxydierte Kaffeesäure anwesend ist bzw. ob nach Zusatz von Reduktionsmitteln noch Kaffeesäure nachzuweisen ist. Solange diese Proben positiv ausfallen, ist zur Zeit des Morphinzusatzes die Anwesenheit von Kaffeesäurechinon sicher. Durch entsprechende Wahl der Versuchsanordnung und eine relativ niedrige Fermentkonzentration konnte die relativ schnelle Reaktion verlangsamt werden, so daß sie sich besser beobachten ließ.

Tab. 12 zeigt die Ergebnisse.

Zeit des Morphinzusatzes	Niederschlagsbildung	Nachweis chinonartiger Oxydationsprodukte der Kaffeesäure mit BESTHORNS Hydrazon	Kaffeesäurenachweis ohne Reduktion	Kaffeesäurenachweis nach Reduktion
nach 15 Min.	+	+	+	+
" 30 "	+	+	+	+
" 45 "	+	+	+	+
" 60 "	+	+	+	+
" 75 "	+	+	+	+
" 90 "	+	+	-	+
" 105 "	+	+	-	+
" 120 "	-	-	-	+
" 135 "	-	-	-	-
" 150 "	-	-	-	-

Tab. 12

Wesentlich ist einmal, daß eine Niederschlagsbildung auf Morphinzusatz auch dann noch eintritt, wenn die Kaffeesäure durch das Ferment vollkommen wegoxydiert ist, wie es bei den Morphinzusätzen nach 90 und 105 Min. der Fall ist. Andererseits endet die Niederschlagsbildung in dem Moment,

in dem bei Zusatz von Reduktionsmitteln keine Kaffeesäure mehr nachweisbar ist, d.h. kein Kaffeesäurechinon in der Reaktionslösung vorhanden sein kann.

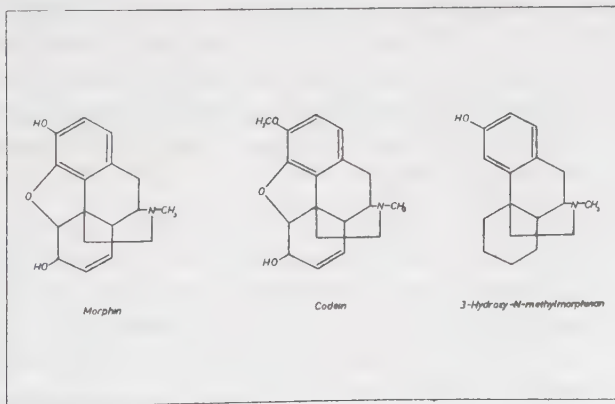
Die Versuchsreihen zeigen, daß eine Niederschlagsbildung nur dann eintritt, wenn die Reaktionslösung monomere, chinonartige Oxydationsprodukte der Kaffeesäure enthält, die sich wieder zu Kaffeesäure reduzieren lassen.

3) Systeme Ferment - Überträger - 3-Hydroxy-N-methylmorphinan und Ferment - Überträger - Codein

Durch die vorausgegangenen Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß zur Bildung der Niederschläge in den Systemen Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin und Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin alle drei Reaktionspartner anwesend sein müssen. Darauf stellte ich mir die Frage, ob sich einzelne dieser Reaktionsteilnehmer durch andere strukturell ähnlich gebaute Stoffe ersetzen lassen.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte einmal das Morphin durch einige verwandte Alkaloide ersetzt werden, während anstelle der Phenoloxydase das Oxydationsenzym Peroxydase genommen werden sollte. Von einem Austausch der phenolischen Überträger wurde hierbei abgesehen.

Als Alkaloide wurden das nichtphenolische Codein und das phenolische 3-Hydroxy-N-methylmorphinan (Dromoran[®]) herangezogen, die unter den optimalen Bedingungen der Niederschlagsbildung eingesetzt wurden.



Durch diese Versuche sollten gleichzeitig Aussagen darüber gewonnen werden, ob das Auftreten von Niederschlägen von dem

Vorliegen einer phenolischen Hydroxylgruppe im Alkaloid abhängt. Infolge der Blockierung der phenolischen Hydroxylgruppe war eine fermentative Oxydation des Codeins über einen Angriff an dieser nicht möglich. Im Gegensatz dazu war sie im 3-Hydroxy-N-methylmorphinan nicht ausgeschlossen.

Bei Verwendung von Dromoran[®] zeigten sich äußerlich die gleichen Erscheinungen wie in den Ansätzen mit Morphin. Unter Aufhellung der Reaktionslösungen gegenüber Ansätzen ohne Alkaloid bildeten sich innerhalb der gleichen Zeitintervalle Niederschläge des gleichen Aussehens. Untersuchungen auf Alkaloide bestätigten die Vermutung, daß die Niederschläge auch alkaloidhaltig waren. Sowohl bei p-Cumarsäure als auch bei Kaffeesäure als Überträger zeigte sich vor und nach der Säureeinwirkung nur ein Alkaloidfleck mit R_f 0,79, der auf Grund von Vergleichschromatogrammen als der Ausgangsstoff Dromoran[®] identifiziert wurde. Alkaloidoxydationsprodukte konnten papierchromatographisch nicht nachgewiesen werden.

Bei Verwendung von Codein lagen die Verhältnisse anders. Im System Phenoloxydase - Kaffeesäure - Codein zeigte sich innerhalb 90 Min. kein Niederschlag, und die Reaktionslösung hatte das gleiche Aussehen wie ein Ansatz ohne Codein. Eine längere Fermenteinwirkung ist für eine Oxydation ohne Bedeutung, da manometrisch kein erhöhter Sauerstoffverbrauch mehr festgestellt werden kann.

Bei p-Cumarsäure als Überträger trübte sich die Lösung nach einer Reaktionszeit von etwa 3 Stunden. Nach 18 Stunden war ein deutlicher Bodensatz vorhanden, jedoch gegenüber dem System Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Dromoran[®] erheblich weniger. Auch war die Reaktionslösung nur wenig aufgehellt worden gegenüber einem Ansatz ohne Codein. Die Prüfung auf Alkaloide war auch in diesem Falle positiv. Der in der üblichen Weise ausgewaschene Niederschlag zeigte vor und nach der Säureeinwirkung einen Alkaloidfleck mit demselben R_f -Wert 0,56 wie Codein. Oxydationsprodukte des Codeins waren ebenfalls nicht sichtbar.

Aus diesen Untersuchungen ist ersichtlich, daß die phenolische Hydroxylgruppe für die Niederschlagsbildung eine wesentliche Rolle spielt, da bei Blockierung des Hydroxyls durch Methylierung die Niederschlagsbildung ausbleibt oder stark vermindert wird; sie scheint aber nicht in allen Fällen verhindert zu werden.

4) Systeme Peroxydase/Wasserstoffperoxid - Kaffeesäure -
Morphin und Peroxydase/Wasserstoffperoxid - p-Cumarsäure -
Morphin

Durch K.H. FRÖMMING (23) wurde das Auftreten von Pseudomorphin bei papierchromatographischen Untersuchungen des Systems Peroxydase/Wasserstoffperoxid - Morphin beschrieben. Die Versuche konnten inzwischen durch H. SIMON (9) auf spektralphotometrischem Wege bestätigt werden.

Die folgenden Untersuchungen hatten nun zum Ziel festzustellen, wie die bei der fermentativen Oxydation des Morphins durch Phenoloxydase notwendigen Überträger Kaffeesäure und p-Cumarsäure die Pseudomorphinbildung durch Peroxydase/Wasserstoffperoxid beeinflussen. Es wurde dabei von den optimalen Bedingungen der Niederschlagsbildung unter Einwirkung der Phenoloxydase ausgegangen.

Der Reaktionsansatz mit Wasserstoffperoxid, Kaffeesäure und Morphin färbte sich auf Zusatz von Peroxydase sofort braun, und es fiel ein brauner Niederschlag aus. Dieser bildet sich bei Abwesenheit von Morphin nicht. Nach 18 Stunden wurde er abgetrennt und auf Alkaloide geprüft.

Hierbei stellte sich heraus, daß er bei der Papierchromatographie vor der Säureeinwirkung einen mit Alkaloidreagenz positiv reagierenden Streifen vom Startfleck ab bis etwa R_f 0,40 zeigte. Nach der Säureeinwirkung war ein im kurzwelligen UV-Licht dunkel erscheinender Fleck mit R_f 0,44, der sich mit Alkaloidreagenz anfärben ließ, und ein sehr schwacher, im UV-Licht hellblau fluoreszierender und mit Alkaloidreagenz anfärbbarer Fleck mit R_f 0,18 sichtbar. Durch Vergleichschromatogramme wurde Gleichheit der R_f -Werte mit Morphin und Pseudomorphin festgestellt.

Die Prüfung des Niederschlages auf Aminosäuren ergab im eindimensionalen Chromatogramm mit Sicherheit 7 Flecke mit

R_f 0,63; 0,51; 0,47; 0,34; 0,29; 0,22; 0,11.

Es war also auch hier eine Beteiligung des Ferments am Niederschlag nachzuweisen.

Auffällig war der geringe Gehalt an Pseudomorphin, der vermuten ließ, daß das Oxydationspotential der eingesetzten Menge Peroxydase/Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Kaffeesäure in erster Linie diese oxydiert und erst, wenn alle Kaffeesäure oxydiert ist, das Morphin zu Pseudomorphin oxydiert wird.

Um dies zu beweisen, wurde die Reaktionszeit von 18 Stunden auf 35 sec. herabgesetzt. Durch Kontrollversuche war vorher festgestellt worden, daß zu diesem Zeitpunkt noch nicht-oxydierte Kaffeesäure im Ansatz vorhanden ist. Der unter diesen Bedingungen entstandene Niederschlag enthielt nur noch Morphin.

Es läßt sich also für das System Peroxydase/Wasserstoffperoxid - Kaffeesäure - Morphin folgender Reaktionsmechanismus diskutieren: Durch Peroxydase/Wasserstoffperoxid wird die Kaffeesäure durch Entzug zweier Elektronen zum Chinon oxydiert, das ähnlich wie im System Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin zusammen mit dem Fermenteiweiß und dem Morphin unter Niederschlagsbildung reagiert.

Die Bildung von Pseudomorphin im System Peroxydase/Wasserstoffperoxid - Morphin wird durch einen Kaffeesäurezusatz gehemmt.

Der Reaktionsansatz mit Wasserstoffperoxid, p-Cumarsäure und Morphin färbte sich auf einen Zusatz von Peroxydase sofort gelb, und nach 22 sec. fiel ein reinweißer Niederschlag aus. Während der Niederschlagsbildung hatte sich die Lösung wieder soweit aufgehellt, daß sie fast farblos war.

Bei der Prüfung auf Alkaloide zeigte sich papierchromatographisch nur ein einziger, im kurzwelligen UV-Licht stark hellblau fluoreszierender Fleck mit R_f 0,20. Als Vergleich mitchromatographiertes Pseudomorphin zeigte dieselbe Fluoreszenz und denselben R_f -Wert.

Die papierchromatographische Prüfung mit Ninhydrin auf

Eiweißbestandteile verlief negativ.

Die reinweiße Färbung der unlöslichen Verbindung in Zusammenhang mit den papierchromatographischen Daten zeigten, daß es sich hier um Pseudomorphin handelte.

Ein Vergleichsansatz, der keine p-Cumarsäure enthielt, bildete im Gegensatz zu dem vorangegangenen Versuch erst nach 6 Min. 29,0 mg weißen Niederschlag. Auch diese Substanz zeigte papierchromatographisch nur einen mit Alkaloidreagenz anfärbbaren, im UV-Licht stark hellblau fluoreszierenden Fleck mit Rf 0,20. Es handelte sich also hierbei auch um Pseudomorphin. Die Elementaranalyse bestätigte dies.



ber.: C 65,58%; H 6,79%; N 4,50%; O 23,13%

gef.: C 65,09%; H 6,64%; N 4,54%; O 23,09%

Im Gegensatz zu Kaffeesäure ist bei Anwesenheit von p-Cumarsäure eine deutliche Förderung der Pseudomorphinbildung zu beobachten. Dies gilt sowohl für die Ausbeute als auch für die Reaktionsgeschwindigkeit. Es kann hierbei eine gewisse Parallele zu den Ansätzen mit Phenoloxydase gezogen werden, wo das System Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin eine Pseudomorphinbildung hervorrief, das System Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin aber nicht.

Die vermehrte Pseudomorphinbildung bei Verwendung von p-Cumarsäure könnte mit unterschiedlichen Reaktionsmechanismen bei der Einwirkung von Peroxydase/Wasserstoffperoxid auf p-Cumarsäure und Kaffeesäure erklärt werden. p-Cumarsäure würde hiernach bei der Oxydation nach einem Radikalmechanismus oxydiert werden; das dabei entstehende Radikal würde mit dem Morphin in Reaktion treten, wobei zwei Morphinradikale sich zu einem Molekül Pseudomorphin stabilisieren. Dieses p-Cumarsäureradikal hat nicht die Möglichkeit, mit dem Fermenteiweiß in Reaktion zu treten, so daß der Niederschlag in dem System Peroxydase/Wasserstoffperoxid - p-Cumarsäure - Morphin kein Eiweiß enthält. Kaffeesäure dagegen wird unter Abspaltung von zwei Elektronen in das entsprechende Chinon überführt, das dann mit dem Eiweiß in Reaktion tritt. Kaffeesäurechinon hat nicht die Möglichkeit, Morphin zu Pseudomorphin zu oxydieren.

C. Beschreibung der Versuche

I. Gewinnung der Phenoloxydase und Messung der Aktivität

Die Kartoffelsorte "Ackersegen" wurde als Ausgangsstoff für die Gewinnung der Phenoloxydase verwendet. Als Vorschrift diente die von F. KUBOWITZ (24, 25) ausgearbeitete Methode. Hierzu wurden die äußeren Teile der gewaschenen Kartoffeln auf Kunststoffreiben in eine abgemessene Menge Eiswasser gerieben und dieser Brei bis zur zweiten Ammoniumsulfatfällung und anschließender Dialyse verarbeitet. Damit Aktivitätsverluste möglichst vermieden wurden, kamen nur Kunststoff-, Glas- oder Porzellangegegenstände mit der Fermentpräparation in Berührung.

Die Arbeiten bis zur Dialyse wurden an einem Tage bei einer Temperatur von 2-4°C durchgeführt. Das Abzentrifugieren der Niederschläge erfolgte in einer Kühlzentrifuge bei 0°C. Die nach der Dialyse erhaltene Fermentlösung wurde zur Erhöhung der Haltbarkeit lyophilisiert. 20 kg Kartoffeln ergaben 3,2 g Trockenferment in Form einer gelblich-weißen Präparation, die im Kühlraum bei 0°C aufbewahrt wurde.

Zu den Versuchen wurde jeweils eine Lösung von 60,0 mg Trockenferment zu 10,0 ml bidestilliertem Wasser hergestellt. Von dieser Stammlösung kamen dann bestimmte Mengen zur Anwendung.

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in der WARBURG-Apparatur (26) mit p-Cresol als Substrat nach der Methode von M. GRAUBARD und J.M. NELSON (27). 1,0 mg Ferment entsprach 8,5 Cresolase-Einheiten und entsprechend 1,0 ml Fermentstammlösung 51 Cresolase-Einheiten. 1 Cresolase-Einheit ist nach M. GRAUBARD und J.M. NELSON (27) definiert als die Aktivität einer Fermentmenge, die bei pH 6,0 und 25°C bei der Einwirkung auf 9,0 mg p-Cresol in 5,0 ml Lösung eine Sauerstoffaufnahme von 10 μ l pro Minute während der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit hervorruft.

II. Papierchromatographie

Zur Papierchromatographie wurde Papier Whatman Nr. 1, 18 x 58 cm und zur Entwicklung die obere Phase des Partridge-Gemisches n-Butanol - Eisessig - Wasser (4:1:5, v/v/v) verwendet. Es wurde absteigend bei Zimmertemperatur (20°C) chromatographiert. Die Laufzeit betrug 15 Stunden.

Die Anfärbung der Alkaloide auf dem Papier erfolgte durch Besprühen mit einer Mischung aus gleichen Raumteilen einer 1,4%igen wässrigen Kaliumjodidlösung und einer 0,135%igen wässrigen Platinchloridchlorwasserstoffsäurelösung (28). Hierdurch traten die Alkaloidflecke violett hervor.

III. Quantitative Morphinbestimmung

Die Bestimmung des Morphins erfolgte kolorimetrisch nach der von E. SCHWALB (7) angegebenen Methode, indem das Morphin papierchromatographisch abgetrennt, eluiert und nach Überführung in 2-Nitrosomorphin im ELKO II mit dem Filter S45E56 kolorimetrisch bestimmt wurde. Vor und nach der Reaktion wurden jeweils aliquote Teile der Lösung chromatographiert.

IV. Abhängigkeit der Niederschlagsbildung in den Systemen Phenoloxydase - Überträger - Morphin von den Reaktionsbedingungen

1) Kaffeesäure als Überträger

Die Grundansätze hatten folgende Zusammensetzung:

1. 60,0 mg Kaffeesäure und
60,0 mg Morphin-HCl, gelöst in einer Mischung aus
12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10) und
12,0 ml destilliertem Wasser
6,0 ml Fermentverdünnung mit 6,0 - 60,0 Cresolase-
Einheiten

2. 10,0-100,0 mg Morphin-HCl und
 - 60,0 mg Kaffeesäure, gelöst in einer Mischung aus
 - 12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach MC ILVAINE (10) und
 - 12,0 ml destilliertem Wasser
 - 6,0 ml Fermentverdünnung mit 36 Cresolase-Einh.
3. 10,0- 60,0 mg Kaffeesäure und
 - 100,0 mg Morphin-HCl, gelöst in einer Mischung aus
 - 12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach MC ILVAINE (10) und
 - 12,0 ml destilliertem Wasser
 - 6,0 ml Fermentverdünnung mit 36 Cresolase-Einh.

Je nachdem, wieviele Parallelansätze benötigt wurden, wurden 6 oder 10 Erlenmeyerkolben zu 100 ml mit Reaktionslösung 90 Min. bei 22°C gleichzeitig in der Schüttelmaschine geschüttelt. Anschließend wurden die verschiedenen entstandenen Niederschläge durch viertelstündiges Zentrifugieren bei 10000 UpM und 0°C abzentrifugiert, in einen Tiegel P₁ überführt, mit 3,0 ml destilliertem Wasser gewaschen und nach dreistündigem Trocknen bei 105°C gewogen.

2) p-Cumarsäure als Überträger

1. 20,0-200,0 mg Morphin-HCl und
 - 60,0 mg p-Cumarsäure, gelöst in einer Mischung aus
 - 12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach MC ILVAINE (10) und
 - 12,0 ml destilliertem Wasser
 - 6,0 ml Fermentverdünnung mit 36 Cresolase-Einh.
2. 10,0- 60,0 mg p-Cumarsäure und
 - 140,0 mg Morphin-HCl, gelöst in einer Mischung aus
 - 12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach MC ILVAINE (10) und
 - 12,0 ml destilliertem Wasser
 - 6,0 ml Fermentverdünnung mit 36 Cresolase-Einh.

Die Untersuchungsbedingungen waren analog wie bei Kaffeesäure als Überträger, jedoch betrug die Reaktionsdauer der Ansätze jeweils 18 Stunden, wovon in den ersten 6 Stunden geschüttelt wurde.

V. Abhängigkeit Niederschlagsbildung/Morphinabnahme

Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

Kaffeensäure als Überträger

Reaktionsansatz a)

60,0 mg Kaffeensäure und
140,0 mg Morphin-HCl, gelöst in einer Mischung aus
24,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10) und
24,0 ml destilliertem Wasser

Reaktionsansatz b)

20,0 mg Kaffeensäure und
200,0 mg Morphin-HCl, gelöst in einer Mischung aus
24,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10) und
24,0 ml destilliertem Wasser

Von den Ansätzen wurden jeweils 3 x 0,080 ml zur quantitativen Morphinbestimmung entnommen und dann je 24,0 ml dieser Reaktionslösungen mit 6,0 ml Fermentverdünnung (= 36 Cresolase-Einh.) versetzt.

Die Lösungen wurden gleichzeitig 90 Min. lang bei 22°C in der Schüttelmaschine geschüttelt und nach der Reaktion jeweils 3 x 0,100 ml klarer Lösung zur Morphinbestimmung chromatographiert.

p-Cumarsäure als Überträger

Reaktionsansatz a)

40,0 mg p-Cumarsäure und
280,0 mg Morphin-HCl, gelöst in einer Mischung aus
24,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10) und
24,0 ml destilliertem Wasser

Reaktionsansatz b)

120,0 mg p-Cumarsäure und
280,0 mg Morphin-HCl, gelöst in einer Mischung aus
24,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10) und
24,0 ml destilliertem Wasser

Die Reaktionsbedingungen waren wie bei Kaffeesäure als Überträger, jedoch wurden die Ansätze gleichzeitig 6 Stunden lang geschüttelt und noch weitere 12 Stunden lang stehen gelassen.

VI. Zusammensetzung der Niederschläge

1) Herstellung der Niederschläge

Zur Herstellung des Niederschlages mit p-Cumarsäure als Überträger wurde jeweils von folgendem Ansatz ausgegangen:

60,0 mg Morphin-HCl und
60,0 mg p-Cumarsäure, gelöst in einer Mischung aus
12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10) und
12,0 ml destilliertem Wasser
6,0 ml Fermentverdünnung (1 Teil Stammlösung +
9 Teile bidestilliertes Wasser)

Morphin und p-Cumarsäure wurden im Wasser und Puffer gelöst und die Lösung filtriert. Anschließend wurde die Fermentverdünnung zugesetzt und die Lösung 6 Stunden bei 20°C geschüttelt. Der Ansatz wurde dann noch weitere 12 Stunden stehen gelassen.

Der gebildete Niederschlag wurde bei 0°C und 10000 UpM abzentrifugiert. Um ihn völlig rein zu erhalten und von nicht umgesetzten Reaktionsteilnehmern zu befreien, wurde er in 20 ml Wasser fein aufgeschlämmt, abermals zentrifugiert und das Waschwasser verworfen. Das Aufschlämmen und Abzentrifugieren wurde insgesamt 15mal durchgeführt. Vom letzten Waschwasser wurden 0,5 ml papierchromatographisch auf Alkaloide untersucht. Der Nachweis war negativ, d.h. das nichtumgesetzte Morphin war vollkommen ausgewaschen worden.

Zur Herstellung des Niederschlages mit Kaffeesäure als Überträger wurde jeweils von folgendem Ansatz ausgegangen:

- 60,0 mg Morphin-HCl und
- 60,0 mg Kaffeesäure, gelöst in einer Mischung aus
- 12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10) und
- 12,0 ml destilliertem Wasser
- 6,0 ml Fermentverdünnung (1 Teil Stammlösung +
9 Teile bidestilliertes Wasser)

Die Reaktionsbedingungen waren analog der Herstellung des Niederschlages bei p-Cumarsäure als Überträger, nur wurde der Ansatz 90 Min. lang geschüttelt. Nach dem Auswaschen und Abzentrifugieren wurde das Waschwasser ebenfalls auf die Abwesenheit nichtumgesetzten Morphins untersucht. Der Morphinnachweis war negativ.

2) Aminosäurennachweis

in den Niederschlägen

Die Hydrolyse der Niederschläge wurde in Anlehnung an das Verfahren von J.E. EASTOE (11) vorgenommen. Jeweils etwa 5 mg Niederschlag wurden mit 0,5 ml 20%iger Salzsäure in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen 30 Stunden lang auf 105°C erhitzt und anschließend die Säure bei Raumtemperatur im Vakuum über Phosphorpentoxid und Natriumhydroxid entfernt. Das Hydrolysat wurde in 0,5 ml 70%igem Methanol gelöst und davon 0,1 ml papierchromatographisch untersucht. Als Entwicklungsflüssigkeit diente n-Butanol - Eisessig - Wasser (4:1:1, v/v/v).

Nach dem Entwickeln und Trocknen wurde das Chromatogramm mit 0,2%iger Ninhydrinlösung besprüht und 10 Min. bei 105°C getrocknet.

in der Phenoloxydase

1,0 mg Phenoloxydase wurde mit 0,5 ml 5%iger Salzsäure in ein Hydrolyseröhrchen eingeschmolzen und 18 Stunden lang bei 105°C hydrolysiert. Danach wurde die Säure im Vakuum über Natriumhydroxid und Phosphorpentoxid bei Zimmertem-

peratur abgedampft, der Rückstand in 0,2 ml Methanol (70%) gelöst und 0,02 ml chromatographiert. Das Chromatogramm wurde dann wie bei der Niederschlagsuntersuchung weiterbehandelt.

3) Alkaloidnachweise

a) Säurebehandlung des Morphins

Je 5,0 mg Morphin-HCl wurden erst mit 0,5 ml 20%iger und dann mit 5, 10, 15 und 20%iger Salzsäure 30 Stunden lang auf 105°C erhitzt und die Säure im Vakuum über Natriumhydroxid und Phosphorpentoxid bei Zimmertemperatur abgedampft. Der Rückstand wurde in 1,0 ml Methanol gelöst und 0,05 ml chromatographiert, wobei unbehandeltes Morphin und Apomorphin als Vergleich mitliefen.

b) Vorbehandlung der Niederschläge

Etwa 5 mg der ausgewaschenen Reaktionsniederschläge wurden in einem Hydrolyseröhrchen in 0,5 ml 50%iger Essigsäure gelöst. Von der Lösung wurde 0,1 ml papierchromatographisch auf Alkaloide untersucht.

Zu den restlichen 0,2 ml Niederschlagslösung wurde 0,1 ml 10%ige Salzsäure zugesetzt, das Röhrchen vorsichtig zugeschmolzen und das Gemisch 6 Stunden lang auf 105°C erhitzt. Danach wurden 0,15 ml der überstehenden Lösung papierchromatographisch ebenfalls auf Alkaloide untersucht.

c) Alkaloidanreicherung

Es wurde von folgenden Ansätzen ausgegangen:

- 1,0 g Morphin-HCl und
- 1,0 g p-Cumarsäure bzw.
- 1,0 g Kaffeesäure, gelöst in einer Mischung
aus
- 200,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0
nach MC ILVAINE (10) und
- 200,0 ml destilliertem Wasser
- 10,0 ml Fermentstammlösung

Morphin und Überträger wurden in den Lösungsmitteln gelöst und in ein 500 ml fassendes Becherglas filtriert. An-

schließlich erfolgte der Fermentzusatz. Das Reaktionsgefäß stand in einem Thermostaten bei 25°C, und statt des Schüttelns wurde Sauerstoff eingeleitet. Nach 18 Stunden (bei p-Cumarsäure) bzw. 90 Min. (bei Kaffeesäure) wurden die Niederschläge bei 0°C und 10000 UpM abzentrifugiert und 15mal mit je 100 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde 6 Stunden lang bei 105°C mit 10,0 ml 5%iger Salzsäure behandelt.

Die Säure wurde im Vakuum über Phosphorpentoxid und Natriumhydroxid bei Zimmertemperatur verdampft. Zur Kontrolle auf die Anwesenheit des Alkaloidfleckes mit Rf 0,45 bzw. 0,20 wurden etwa 2 mg des Rückstandes in 0,2 ml Methanol gelöst und chromatographiert. Der Nachweis war positiv.

Aus dem Rest des Rückstandes wurde ein Alkaloidextrakt hergestellt. Dazu wurde dieser mit 10,0 ml destilliertem Wasser übergossen, unter häufigem Umrühren eine Stunde lang stehengelassen und anschließend die ungelösten Bestandteile abzentrifugiert. Die klare, wässrige Lösung wurde mit 10%iger Ammoniakflüssigkeit alkalisch gemacht und 5mal mit einer Mischung aus Chloroform-Isopropanol (3+1, v/v) ausgeschüttelt. Die vereinigten Auszüge wurden mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter schwachem Erwärmen eingedampft.

d) Identifizierung des Morphins

Zur Aufnahme des UV-Spektrums des Alkaloids mit dem Rf-Wert 0,45 wurden jeweils etwa 5 mg Extrakt aus den Niederschlägen der Systeme Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin bzw. Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin in 0,5 ml Methanol gelöst, die ganze Menge auf 3 Flecke verteilt und chromatographiert. Nach dem Entwickeln und Trocknen wurde die Lage der Alkaloidflecke im UV-Licht festgestellt, die Papierstreifen mit dem Alkaloid ausgeschnitten und jeweils in mehrere kleine Stücke zerschnitten. Die Papierstücke wurden dann in einem Schüttelzylinder mit 10,0 ml Methanol p.a. übergossen und das Ganze zwei Stunden lang extrahiert.

Zur Vergleichslösung dienten gleichgroße Papierstücke ohne Alkaloid, die in der gleichen Weise mit Methanol behandelt und extrahiert worden waren.

Beide Lösungen wurden durch eine Glasfritte G4 gesaugt und das Alkaloid spektrophotometrisch untersucht. Das Spektrum wurde wie das der methanolischen Morphin-HCl-Vergleichslösung in einer 1cm-Quarzküvette im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bei 25°C aufgenommen.

Die Tüpfelreaktionen nach FROEDE, ERDMANN, MANDELIN und MARQUIS (14) wurden mit dem nach dem Verdampfen des Methanols bleibenden Rückstand gemacht.

Zur Mikrofarbreaktion nach YUN-HSIAN YU (15) auf Morphin wurde eine geringe Menge Alkaloidextrakt in einem kleinen Reagenzglas in 2 Tr. konz. Schwefelsäure gelöst und 1 Tr. Nitrobenzol hinzugefügt. Auf kleiner Flamme wurde zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen mit 3 Tr. Wasser verdünnt. Nach dem Schütteln mit 2 Tr. n-Butanol trat die für Morphin charakteristische violettblaue Färbung auf.

e) Identifizierung des Pseudomorphins

aa) Spektrophotometrischer Nachweis

Die Abtrennung des Pseudomorphins aus dem Niederschlagsextrakt geschah papierchromatographisch auf zwei Papierbogen Whatman Nr. 1, 15 x 58 cm. Diese waren vorher 28 Tage lang mit Methanol wie ein Durchlaufchromatogramm eluiert worden, um einen großen Teil der in Methanol löslichen Papierbestandteile zu entfernen, da diese bei der späteren UV-Spektrophotometrie stören. Die Papierbogen wurden in der Längsrichtung in drei 5 cm breite Streifen unterteilt und dann zwischen ihnen ein 2 mm breites Papierstück ausgeschnitten.

In der Mitte dieser nun etwa 4,8 cm breiten Bahnen wurde abermals ein 2 mm breiter Streifen ausgeschnitten, so daß die Bogen zwar noch zusammenhängen, die Flecken jedoch auf völlig getrennten, gleichbreiten Streifen laufen konnten (Abb. 4).

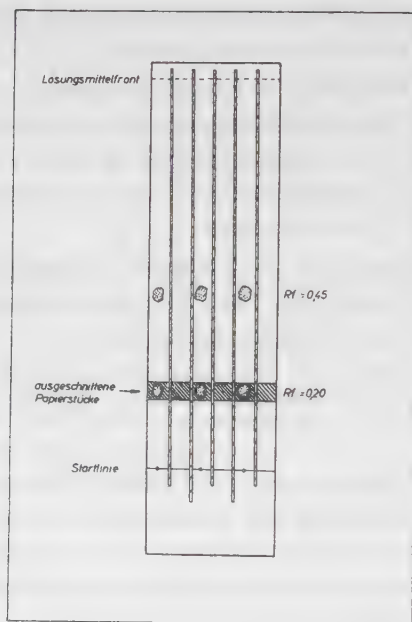


Abb. 4: Skizze des Chromatogramms

20,0 mg des Niederschlagsextraktes aus dem System Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin wurden in 3,0 ml Methanol p.a. gelöst und 6mal 0,5 ml so aufgetragen, daß jeder zweite Papierstreifen Substanz trug, der danebenliegende Streifen aber leerblieb. Die Chromatogramme wurden 3 Stunden lang äquilibriert und anschließend mit Partridge-Gemisch (4:1:5, obere Phase) entwickelt. Nach dem Trocknen wurde die Lage der Flecke mit R_f 0,20 im durchfallenden UV-Licht festgestellt und die Flecke ausgeschnitten.

Aus den benachbarten leeren Papierstreifen wurden ebenfalls gleichgroße Flecke in derselben Höhe des Papierbogens ausgeschnitten.

Die sechs Papierstücke, die die Substanz enthielten, und die sechs leeren Papierstücke wurden jeweils für sich zusammengefaßt und mit Hilfe von Kapillaren gleichzeitig in

90 Min. mit 3,5 ml Methanol p.a. eluiert. Anschließend wurde das UV-Spektrum der Alkaloidlösung gegen die Blindlösung, die nur eluierte Papierbestandteile enthielt, in einer 1cm-Quarzküvette bei 25°C im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II aufgenommen und mit dem Spektrum einer methanologischen Pseudomorphinlösung verglichen.

bb) Isolierung des Pseudomorphins

Es wurde von folgenden Mengen ausgegangen:

20,0 g Morphin-HCl und

20,0 g p-Cumarsäure, gelöst in einer Mischung aus
4000,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10) und

4000,0 ml destilliertem Wasser

200,0 ml Fermentstammlösung

Ansätze, die 2,0 g Morphin-HCl bzw. 2,0 g p-Cumarsäure aliquot waren, wurden in einem zwei Liter fassenden Standkolben in einer Schüttelmaschine bei 25°C 18 Stunden lang geschüttelt, wobei zur Sauerstoffzufuhr von Zeit zu Zeit der Kolben geöffnet wurde. Danach wurde der Niederschlag bei 0°C und 10000 UpM abzentrifugiert und mit 25 ml 5%iger Salzsäure 6 Stunden lang bei 105°C in einem zugeschmolzenen Glasrohr behandelt.

Die Säure wurde anschließend im Vakuum über Phosphorpentoxid und Natriumhydroxid bei Zimmertemperatur verdampft. Der Rückstand wurde mit 20 ml destilliertem Wasser übergossen und unter häufigem Umrühren eine Stunde lang stehen gelassen. Nach Entfernung der ungelösten Bestandteile wurde die Lösung mit 10%iger Ammoniakflüssigkeit alkalisch gemacht und mehrmals mit Chloroform-Isopropanol (3+1, v/v) ausgeschüttelt. Die vereinigten Auszüge wurden mit geglähtem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter schwachem Erwärmen eingedampft. Insgesamt konnten so 990 mg Niederschlagsextrakt hergestellt werden, der nun säulenchromatographisch in Morphin und Pseudomorphin getrennt wurde.

Ein Chromatographierohr von 40 cm Länge und einem Durchmesser von 2,5 cm wurde mit einer Aufschlammung von 40,0 g Whatman-1-Zellulosepulver in der oberen Phase des Partridge-Gemisches n-Butanol - Eisessig - Wasser (4:1:5, v/v/v) gleichmäßig gefüllt. Anschließend wurde die Säule drei Tage lang mit insgesamt 750 ml Partridge-Gemisch eluiert.

Auf eine derartig vorbereitete Säule wurde jeweils eine Lösung von 100 mg Niederschlagsextrakt in 2,5 ml Partridge-Gemisch in kleinen Anteilen gegeben. Es wurde zweimal mit je 5 ml nachgespült und dann im Fraktomaten mit der oberen Phase der Mischung n-Butanol - Eisessig - Wasser (4:1:5) so chromatographiert, daß in 7 Min. eine Fraktion (= 5 ml) durchlief.

Fraktionen, die Alkaloid enthielten, wurden dadurch ermittelt, daß jeweils 3 Tr. Eluat auf Filtrierpapier gebracht wurden. Nach dem Trocknen wurden die Flecke im kurzwelligen UV-Licht betrachtet und mit Alkaloidreagenz besprüht. Die Fraktionen mit Alkaloid wurden papierchromatographisch untersucht und dann diejenigen, die das Pseudomorphin enthielten, vereinigt und im Vakuumumlaufverdampfer bei 40°C und 12 mm Hg zur Trockne gebracht. Der Rückstand war bräunlich gefärbt, jedoch papierchromatographisch rein. Er lief einheitlich mit Rf 0,18 und zeigte die starke hellblaue Fluoreszenz im UV-Licht.

Insgesamt wurden 61 mg noch verunreinigtes Pseudomorphin isoliert. Mit diesem Produkt wurden folgende Farbreaktionen (17) gemacht:

1. Mit Formaldehyd-Schwefelsäure trat intensive Gelbrotfärbung auf.
2. Mit konz. Schwefelsäure und etwas Rohrzucker trat Grünfärbung auf.
3. Etwa 1 mg Substanz gab mit konz. Schwefelsäure eine gelbe Lösung, die beim schwachen Erwärmen intensiv grün wurde. Nach dem Erkalten wurden 10 Tr. Wasser hinzugefügt, wobei eine Rosafärbung auftrat. Die Lösung wurde mit weiteren 50 Tr. Wasser versetzt, wobei sich die Flüssigkeit trübte.

Jetzt wurde die Lösung in drei gleiche Teile geteilt und I mit 10 Tr. konz. Salpetersäure, II mit 1 Tr. 5%iger Natriumnitritlösung und III mit 1 Tr. Natriumhypochloritlösung versetzt.

In allen drei Fällen trat eine dunkle Violettfärbung auf.

Vergleichsproben mit authentischem Pseudomorphin zeigten die gleichen Ergebnisse.

Nach O. HESSE (29) wurde die rohe Substanz in 10%igem Ammoniak gelöst und daraus zweimal umkristallisiert. Nach dem Trocknen im Exsikkator blieben 0,74 mg eines gelblichen, kristallinen Produktes mit einem Schmelzintervall von 330 - 335°C unter Zersetzung (Kofler-Heiztischmikroskop).

Die Substanz zeigte beim Chromatographieren den Rf-Wert des Pseudomorphins und die starke Fluoreszenz im UV-Licht. Zur Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten und des UV-Spektrums wurde sie in der Trockenpistole bei 100°C im Vakuum über Phosphorpentoxid drei Stunden lang getrocknet.

Anschließend wurden 0,246 mg getrocknete Substanz in 25,0 ml Methanol p.a. gelöst und die Extinktion in einer 1cm-Quarzküvette bei 237 m μ und 25°C im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II gemessen. Dieselbe Lösung diente zur Aufnahme des UV-Spektrums.

f) Nichtfermentative Herstellung von Pseudomorphin als Vergleichspräparat

Das Pseudomorphin wurde nach der Vorschrift von K. POLSTORFF (30) hergestellt. 1,5 g Morphin-HCl wurden in 300,0 ml destilliertem Wasser gelöst und dazu die Lösung von 0,3 g KOH in 100,0 ml destilliertem Wasser gegeben. Die ausgefallene Base wurde durch Erhitzen am Rückflußkühler in Lösung gebracht, filtriert und nach dem Erkalten langsam eine Lösung von 1,65 g Kaliumferricyanid in 5,0 ml Wasser zugegeben. Gleichzeitig wurde ein Kohlendioxidstrom durch die Mischung geleitet.

Der entstandene gelbe Niederschlag wurde erst mit Wasser, dann mit Aethanol gewaschen und schließlich mit 300,0 ml Wasser gekocht, dem einige Tropfen Sodalösung zugesetzt worden waren. Das zurückgebliebene Pulver (Pseudomorphin) wurde in verdünnter Salzsäure gelöst, die Lösung filtriert und mit Wasser verdünnt. Es wurde nun Ammoniakflüchtigkeit (25%) zugesetzt, bis der zuerst entstandene Niederschlag wieder verschwunden war, und dann so lange auf dem Wasserbad erwärmt, bis das Pseudomorphin sich als schweres Kristallpulver abgesetzt hatte.

Die Kristalle wurden anschließend noch zweimal umkristallisiert. Das Pseudomorphin bildete ein grauweißes Kristallpulver, das in Wasser und Aethanol praktisch unlöslich war. Es zersetzte sich zwischen 325°C und 330°C (Kofler-Heiztischmikroskop). Literatur (19): etwa 327°C (Zers.)

Bei der Chromatographie lief die Substanz einheitlich. Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten wurde sie im Vakuum bei 100°C über Phosphorpentoxid bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann 0,178 mg in 25,0 ml Methanol p.a. gelöst. Die Extinktion wurde im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bei 25°C in einer 1cm-Quarzküvette bei 237 m μ gemessen.

$$E = \frac{\epsilon}{c \cdot d} = 41300$$

In der Literatur (18) wird ein Wert von 40040 angegeben.

g) Quantitative Morphinbestimmung im System Phenoloxydase-p-Cumarsäure - Morphin und Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin

Es wurde von folgendem Ansatz ausgegangen:

- 50,0 mg Morphin-HCl und
- 25,0 mg p-Cumarsäure bzw.
- 25,0 mg Kaffeesäure, gelöst in einer Mischung aus
- 5,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
- MC ILVAINE (10) und
- 5,0 ml destilliertem Wasser

Nach dem Lösen von Morphin und Überträger in der Mischung aus Wasser und Puffer wurde die Lösung filtriert und 3 x 0,080 ml zur quantitativen Morphinbestimmung nach E. SCHWALB (7) entnommen. Darauf wurden 8,0 ml der Lösung mit 0,5 ml Fermentstammlösung versetzt. Die Mischung wurde bei p-Cumarsäure 18 und bei Kaffeesäure 3 Stunden bei 20°C geschüttelt und dann 4 x 0,085 ml der klaren Lösung zur Morphinbestimmung entnommen. Drei Werte dienten der quantitativen Bestimmung, während die 4. Probe als Leitchromatogramm diente. Anschließend wurde im Ansatz das entnommene Wasser ergänzt und 1,5 ml 33%ige Salzsäure zugesetzt. Die Mischung wurde gut durchgeschüttelt und 48 Stunden lang die Säure einwirken gelassen. Danach wurden 4 x 0,104 ml klarer Lösung zur Morphinbestimmung entnommen, wobei wieder eine Probe als Leitchromatogramm diente.

4) Untersuchung der Beteiligung von Kaffeesäureoxydationsprodukten an der Niederschlagsbildung des Systems Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin

Es wurden 144,0 ml einer Lösung von 360,0 mg Kaffeesäure in einer Mischung gleicher Teile Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach MC ILVAINE (10) und destilliertem Wasser hergestellt. Anschließend wurden 36,0 ml Fermentverdünnung (1 Teil Stammlösung + 19 Teile bidestilliertes Wasser) hinzugefügt. 1,0 ml Reaktionsansatz enthielt folglich 0,5 Cresolase-Einh. Phenoloxydase und 2,0 mg Kaffeesäure.

Der Moment der Fermentzugabe wurde als Zeitpunkt "0" bezeichnet. In 4 Versuchsreihen zu je 10 Reagenzgläsern (Durchmesser 14 mm) wurden nun jeweils 3,0 ml dieser Reaktionslösung (= 6,0 mg Kaffeesäure) in jedes Reagenzglas eingefüllt, die Reaktionsansätze geschüttelt und anschließend in Abständen von 15 Min. in jeder Versuchsreihe folgende Reaktionen durchgeführt:

Versuchsreihe 1: Zugabe von 1,0 ml Morphinlösung (= 6,0 mg Morphin-HCl); es wurde beobachtet, ob eine Niederschlagsbildung eintritt.

Versuchsreihe 2: Zugabe von 0,3 ml methanolischer Lösung von 1,75 g BESTHORNS Hydrazon (31) in 100,0 ml. Das Gemisch wurde mit 1,0 ml Chloroform vorsichtig ausgeschüttelt. Bei Anwesenheit von chinonartigen Oxydationsprodukten der Kaffeesäure zeigte die Chloroformschicht eine Rotfärbung (32).

Versuchsreihe 3: Zur Inaktivierung der Phenoloxydase Zusatz von 0,2 ml 10%iger Salzsäure; die Lösung wurde mit 3,0 ml Essigester ausgeschüttelt. 0,1 ml dieser Essigesterschicht wurde dann chromatographiert und die durch Kaffeesäure hervorgerufene hellblaue Fluoreszenz bei Rf 0,85 beobachtet. Authentische Kaffeesäure als Vergleich.

Versuchsreihe 4: Zusatz von 1,0 ml Ascorbinsäurelösung (= 6,0 mg Ascorbinsäure); nach weiteren 30 Min. Fermentinaktivierung mit 0,2 ml 10%iger Salzsäure; darauf wurde die Lösung mit 3,0 ml Essigester ausgeschüttelt. 0,1 ml der Essigesterschicht wurde papierchromatographisch auf die durch Kaffeesäure hervorgerufene Fluoreszenz bei Rf 0,85 geprüft. Authentische Kaffeesäure als Vergleich.

VII. Systeme Ferment - Überträger - 3-Hydroxy-N-methylmorphinan (Dromoran[®]) und Ferment - Überträger - Codein

Die Reaktionsansätze waren:

p-Cumarsäure als Überträger

- 140,0 mg Dromoran[®] bzw.
- 140,0 mg Codein phos. und
- 20,0 mg p-Cumarsäure, gelöst in einer Mischung aus
- 12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
- MC ILVAINE (10) und
- 12,0 ml destilliertem Wasser
- 6,0 ml Fermentverdünnung mit 36 Cresolase-Einh.

Ebenso wie bei Morphin als Substrat wurden die Ansätze 10 Stunden lang der Fermenteinwirkung ausgesetzt. Die gebildeten Niederschläge wurden dann nach S. 39 ausgewaschen und nach S. 41 auf Alkaloide geprüft.

Kaffeensäure als Überträger

- 70,0 mg Dromoran ^(R) bzw.
- 70,0 mg Codein phos. und
- 30,0 mg Kaffeensäure, gelöst in einer Mischung aus
- 12,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
- MC ILVAINE (10) und
- 12,0 ml destilliertem Wasser
- 6,0 ml Fermentverdünnung mit 36 Cresolase-Einh.

Ebenso wie bei Morphin als Substrat wurden die Ansätze 90 Min. lang der Fermenteinwirkung ausgesetzt. Der bei Dromoran ^(R) gebildete Niederschlag wurde dann nach S. 39 ausgewaschen und nach S. 41 auf Alkaloide geprüft.

VIII. Beschreibung der Peroxydase und Bestimmung der Aktivität

Es wurde mit einer Meerrettich-Peroxydase gearbeitet, die von der Fa. C.F. Boenringer u. Söhne, Mannheim bezogen worden war.

Die Aktivität wurde nach der Guajakolmethode von T.M. DEVLIN (33) bestimmt. Dazu wurden 0,03 ml Fermentlösung (3,8 mg Peroxydase/10,0 ml Wasser) in einer 1cm-Küvette mit 0,05 ml frisch bereiteter 0,02 m Guajakollösung und 2,9 ml m/10 Phosphatpuffer pH 7,0 gemischt und die Extinktion bei 470 m μ gemessen. Dann wurden 0,02 ml 0,04 n Wasserstoffperoxidlösung zugesetzt und die Zeit gemessen, in der ein um 0,050 höher liegender Extinktionswert erreicht wurde als der zuerst abgelesene. Als Vergleichslösung wurde destilliertes Wasser genommen. Die Temperatur betrug 25,0°C und die benötigte Zeit 16,9 sec. Die Berechnung der Fermentkonzentration erfolgte nach der von B. CHANCE (34) angegebenen Gleichung zu $4,09 \cdot 10^{-9}$ Mol/l, was einem Gehalt von $1,066 \cdot 10^{-9}$ Mol aktiver Peroxydase in 1,0 mg Trockensubstanz entspricht.

IX. Wasserstoffperoxid

Aus Perhydrol [®] der Fa. Merck wurde eine m/10 Wasserstoffperoxidlösung hergestellt, deren Gehalt vor den Versuchen mit n/10 Kaliumpermanganatlösung bestimmt wurde. Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

X. Untersuchung der Systeme Peroxydase/Wasserstoffperoxid - Kaffeesäure - Morphin und Peroxydase/Wasserstoffperoxid - p-Cumarsäure - Morphin

1) Kaffeesäure als Überträger

Der Reaktionsansatz der optimalen Niederschlagsbildung im System Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin wurde übernommen.

70,00 mg Morphin-HCl und

30,00 mg Kaffeesäure, gelöst in einer Mischung aus

12,00 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10),

12,33 ml destilliertem Wasser und

1,67 ml m/10 Wasserstoffperoxidlösung (entsprechend
2 Oxydationsäquivalenten Wasserstoffperoxid
bezogen auf Kaffeesäure)

Dann wurden 4,00 ml wässriger Peroxydaselösung (= 5,0 mg Trockensubstanz) zugesetzt. Die Reaktionsdauer betrug a) 18 Stunden bzw. b) 35 sec. Im Fall b) wurde die Reaktion zu diesem Zeitpunkt durch einen Zusatz von 3,0 ml n/1 Salzsäure gestoppt. Der entstandene Niederschlag wurde ebenso wie bei der Phenoloxydase ausgewaschen und auf Aminosäuren bzw. Alkaloide untersucht, wie auf S. 40 bzw. 41 angegeben ist.

Eine Reaktionslösung ohne Morphin-HCl wurde nur braun gefärbt, ein Niederschlag fiel jedoch nicht aus.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die Niederschlagsbildung schon allein durch das Oxydationsmittel Wasserstoffperoxid ausgelöst wird, wurde ein Kontrollansatz gemacht, der anstelle von 4,00 ml Peroxydaselösung 4,00 ml destilliertes Wasser enthielt. Innerhalb von 24 Stunden bildete

sich jedoch kein Niederschlag. Ein geringer Fermentzusatz trübte anschließend die Lösung sofort.

2) p-Cumarsäure als Überträger

Der Reaktionsansatz der optimalen Niederschlagsbildung im System Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin wurde übernommen.

1. 140,00 mg Morphin-HCl und
20,00 mg p-Cumarsäure, gelöst in einer Mischung aus
12,00 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7,0 nach
MC ILVAINE (10),
13,38 ml destilliertem Wasser und
0,62 ml m/10 Wasserstoffperoxidlösung (entsprechend
1 Oxydationsäquivalent Wasserstoffperoxid
bezogen auf p-Cumarsäure)
Dann wurden 4,00 ml wässriger Peroxydaselösung
(= 5,0 mg Trockensubstanz) zugesetzt.

2. Gleicher Reaktionsansatz, jedoch ohne p-Cumarsäure

Nach 18 Stunden wurde der gebildete weiße Niederschlag nach S. 39 ausgewaschen, nach S. 40 auf Aminosäuren und nach S. 41 auf Alkaloide untersucht.

Ein Kontrollansatz enthielt anstelle von 4,00 ml Peroxydaselösung 4,00 ml destilliertes Wasser. Hierbei fiel kein Niederschlag aus.

Der Niederschlag aus dem zweiten Reaktionsansatz kam nach dreistündigem Trocknen bei 105°C ohne weitere Reinigung zur Elementaranalyse.*

* Die Analyse wurde im Mikroanalyt. Laboratorium
A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr durchgeführt.

XI. Beschreibung der aus dem Handel bezogenen Substanzen

Morphin-HCl

Die Substanz wurde von der Deutschen Hoffmann - La Roche AG, Grenzach/Baden bezogen. Sie entsprach hinsichtlich der Reinheit dem Deutschen Arzneibuch, 6. Ausgabe. Unter den Bedingungen der Papierchromatographie, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, war sie einheitlich.

3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeensäure)

Die Substanz wurde von der Fa. Carl Roth, Karlsruhe bezogen. Sie war als "purum" bezeichnet und lief unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen der Papierchromatographie als einheitlicher Fleck.

4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure)

Die Substanz wurde von der Fa. Carl Roth, Karlsruhe bezogen. Sie war als "purum" bezeichnet und lief unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen der Papierchromatographie als einheitlicher Fleck.

Codein-H₃PO₄

Die Substanz wurde von der Fa. E. Merck AG, Darmstadt bezogen. Sie entsprach hinsichtlich der Reinheit dem Deutschen Arzneibuch, 6. Ausgabe. Unter den Bedingungen der Papierchromatographie, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, war sie einheitlich.

3-Hydroxy-N-methylmorphinan (Dromoran ^(R))

Die Substanz wurde von der Deutschen Hoffmann - La Roche AG, Grenzach/Baden bezogen. Der Schmelzpunkt lag bei 115°C (Lit. 114 - 116°C [35]). Unter den Bedingungen der Papierchromatographie, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, war sie einheitlich.

Apomorphin-HCl

Die Substanz wurde von der Fa. E. Merck AG, Darmstadt bezogen. Sie entsprach hinsichtlich der Reinheit dem Deutschen Arzneibuch, 6. Ausgabe. Unter den Bedingungen der Papierchromatographie, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, war sie einheitlich.

D. Zusammenfassung und Diskussion

Zur weiteren Aufklärung des Reaktionsablaufes der in den Systemen Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin und Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin auftretenden Morphinabnahmen sollte sich diese Arbeit im wesentlichen mit der Zusammensetzung der bei diesen Reaktionen gebildeten Niederschläge beschäftigen.

Theoretisch konnte erwartet werden, daß die Zusammensetzung der Niederschläge in den Systemen mit Kaffeesäure oder p-Cumarsäure als Überträger gleich ist, da nach den anerkannten Vorstellungen (36, 37, 38, 39) die erste Reaktionsstufe der fermentativen Oxydation von Monophenolen in der Einführung einer zweiten Hydroxylgruppe in o-Stellung zur vorhandenen Hydroxylgruppe besteht. Allein das Aussehen der Niederschläge ließ aber an der gleichen Zusammensetzung Zweifel aufkommen. Das System Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin ergab einen braunen Niederschlag, während der Niederschlag des Systems Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin gelb war.

Es konnte festgestellt werden, daß ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung der Niederschläge und den von E. SCHWALB (7) in diesen Systemen gefundenen Morphinabnahmen besteht. Am Beispiel der Kaffeesäure wurde gezeigt, daß Ausfällungen nur bei Anwesenheit der Oxydationsprodukte der Überträger auftreten. Es scheint, daß eine weitergehende Polymerisation zur Niederschlagsbildung nicht nötig ist. Daraus kann auf eine Beteiligung der Kaffeesäureoxydationsprodukte an der Zusammensetzung des Niederschlages geschlossen werden.

Weiter wurde gefunden, daß sowohl das Fermenteiweiß als auch Morphin in den Niederschlägen enthalten sind. Eine Voraussetzung für das Auftreten der Niederschläge ist, daß alle drei Reaktionspartner (Ferment, Überträger, Morphin) beim Ablauf der Oxydationsreaktion anwesend sein müssen. Im System Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin enthielt der Niederschlag außerdem Pseudomorphin, das, wenn auch in geringer Menge, präparativ isoliert werden konnte. Es

wurde versucht, quantitative Aussagen über die Menge des an die Niederschläge gebundenen Morphins zu machen. Im System Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin konnte dabei jedoch trotz Fehlens eines Oxydationsproduktes nur etwa 46% der Morphinabnahme zurückerhalten werden.

Zur Feststellung, ob die phenolische Hydroxylgruppe des Morphins die Niederschlagsbildung begünstigt, wurde es in den untersuchten Systemen durch Codein und 3-Hydroxy-N-methylmorphinan ersetzt. Hierbei zeigte sich, daß die phenolische Hydroxylgruppe die Niederschlagsbildung zwar fördert, ihre Anwesenheit jedoch nicht unbedingt erforderlich ist, da auch in dem System Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Codein ein Niederschlag auftrat.

Die Überträger Kaffeesäure oder p-Cumarsäure wurden dem System Peroxydase/Wasserstoffperoxid - Morphin zugesetzt. Es bildeten sich in beiden Fällen Niederschläge, die jedoch eine andere Zusammensetzung als in den Systemen mit Phenoloxydase hatten. In dem System mit Kaffeesäure als Überträger wurde neben Fermenteiweiß und Morphin in geringer Menge Pseudomorphin nachgewiesen, das sich wahrscheinlich durch direkte Fermenteinwirkung auf Morphin gebildet hat, da Morphin durch Peroxydase/Wasserstoffperoxid oxydiert werden kann. Daneben ist das Auftreten von Oxydationsprodukten der Kaffeesäure im Niederschlag als sicher anzunehmen.

In dem System mit p-Cumarsäure als Überträger scheint der Niederschlag im wesentlichen aus Pseudomorphin zu bestehen. Es konnten in ihm keine Eiweißbestandteile nachgewiesen werden. Weiter wurde festgestellt, daß Kaffeesäure die durch Peroxydase/Wasserstoffperoxid bewirkte Pseudomorphinbildung hemmt und p-Cumarsäure die Pseudomorphinbildung fördert. Es scheint, daß im ersten Fall die Affinität der Peroxydase zur Kaffeesäure größer ist als zum Morphin, so daß als bevorzugtes Substrat die Kaffeesäure angegriffen wird. Erst wenn diese weitgehend oxydiert ist, findet die wesentliche Morphinoxidation statt. Es ist also eine gewisse Parallelität zu den Systemen mit Phenoloxydase

se festzustellen. Auch dort förderte p-Cumarsäure die Pseudomorphinbildung, während Pseudomorphin in Anwesenheit von Kaffeesäure nicht nachgewiesen werden konnte.

Auf Grund der durchgeführten Untersuchungen und unter Berücksichtigung der bisherigen Arbeiten, vorallem von E. SCHWALB (7) und H. SIMON (9), sollten für die Abnahme des Morphingehaltes zwei Reaktionswege verantwortlich zu machen sein.

Zu Beginn dieser Arbeit war angenommen worden, daß in dem System Ferment - p-Cumarsäure - Morphin die bei der Oxydation von Monophenolen zu erwartende Hydroxylierung der p-Cumarsäure eintritt; die sich hierbei bildende 3,4-Dihydroxyzimtsäure wird anschließend zum Chinon oxydiert, das dann mit dem Morphin in Reaktion tritt. Ein solcher Reaktionsweg wurde dadurch erhärtet, daß papierchromatographisch Kaffeesäure als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden konnte und auch der Sauerstoffverbrauch in dem System Ferment - p-Cumarsäure - Morphin größer war als in dem System Ferment - p-Cumarsäure (9).

Mit diesem Reaktionsweg war jedoch nicht ganz in Übereinstimmung zu bringen, daß in dem System Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin, obwohl auch hier eine Morphinabnahme beobachtet wurde, kein Pseudomorphin nachweisbar war und auch kein vermehrter Sauerstoffverbrauch gegenüber dem System Ferment - Kaffeesäure zu beobachten war. Eine Erklärung hierfür konnte sein, daß in dem System Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin weniger Pseudomorphin gebildet wird als in dem System Ferment - p-Cumarsäure - Morphin und dieses Pseudomorphin bereits weiteroxydiert worden war. Es hatte sich in fast allen Fällen gezeigt, daß in Systemen mit Kaffeesäure die Morphinabnahmen kleiner sind als in den Systemen mit p-Cumarsäure. Die geringere Sauerstoffaufnahme war nur mit einer Inhibierung durch die gebildeten Oxydationsprodukte zu erklären.

Eine wertvolle Ergänzung der bisherigen Anschauungen konnte durch die Untersuchung der Systeme Peroxydase/Wasserstoffperoxid - p-Cumarsäure - Morphin bzw. Peroxydase/

Wasserstoffperoxid - Kaffeesäure - Morphin gemacht werden. Hier wurde gefunden, daß in dem zweiten System die wesentliche Pseudomorphinbildung erst einsetzt, wenn die Kaffeesäure wegoxydiert ist. Dagegen wird in dem System Peroxydase/Wasserstoffperoxid - p-Cumarsäure - Morphin durch die Anwesenheit der p-Cumarsäure die Pseudomorphinbildung wesentlich beschleunigt. Es ist bekannt, vor allem auch durch die Untersuchungen von K. FREUDENBERG bei der Ligninbildung (40), daß bei der Einwirkung von Peroxydase/Wasserstoffperoxid auf bestimmte monophenolische Hydroxyzimtsäurederivate Radikale gebildet werden. Unter der Annahme der Bildung eines solchen Radikals bei der Einwirkung von Peroxydase/Wasserstoffperoxid auf p-Cumarsäure wäre die beschleunigte Pseudomorphinbildung verständlich, da sie auf einen Radikalmechanismus zurückgeführt werden könnte.

Bei der Oxydation von Kaffeesäure dürften sich in erster Linie dagegen Chinone bilden. Daraus müßte gefolgert werden, daß auch bei der Oxydation des Systems p-Cumarsäure - Morphin mit der Phenoloxydase neben der zweifellos vorhandenen Hydroxylierung eines Teils der p-Cumarsäure ein anderer Teil zu einem Radikal oxydiert wird, das dann mit dem Morphin unter Pseudomorphinbildung in Reaktion tritt. Die Oxydation der Kaffeesäure dagegen verläuft über die Stufe des Chinons, das nicht mit dem Morphin in Reaktion treten kann.

Der zweite Weg der Morphinabnahme dürfte in einer Reaktion liegen, die mit einer Gerbstoffreaktion zu vergleichen ist. Die Oxydationsprodukte der p-Cumarsäure, vor allem aber die Oxydationsprodukte der Kaffeesäure bilden mit dem Morphin in Gegenwart des Ferments einen alkaloidhaltigen Niederschlag. Die hierbei eintretende Bindung des Morphins ist so fest, daß es durch Wasserextraktion nicht mehr nachgewiesen werden kann. Erst durch einen stärkeren Säurezusatz kann das Morphin aus dieser Bindung gelöst werden. Im System Phenoloxydase - Kaffeesäure - Morphin dürfte die Morphinabnahme im wesentlichen auf diese Bindung zurückzuführen sein. Es konnte zwar nicht das gesamte verschwundene Morphin aus dem Niederschlag zurückgewonnen werden; dies

könnte aber daran liegen, daß nur ein Teil durch die Säure herausgelöst wird. In dem System Phenoloxydase - p-Cumarsäure - Morphin dürfte der Morphinverlust im wesentlichen auf die Oxydation des Morphins zurückzuführen sein.

E. Literaturverzeichnis

- 1 A.M. MACMILLAN u. A. TINGLE, Amer. J. Pharm. 92, 810 (1920)
- 2 H.B. DUNNICLIFF, J.N. RAY u. G. SINGH, Proc. nat. Inst. Sci. India 1, 107 (1935) ref. C. 108, I, 2816 (1937)
- 3 E. STARKENSTEIN u. F. ZETTL, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 187, 259 (1937)
- 4 N.N. WOROSHZOW jr. u. A.T. TROSCHTSCHENKO, C.R. (Doklady) Acad. Sci. USSR 1935 II, 555 ref. C. 107 II, 1382 (1936)
- 5 H.E. ANNETH u. H.D. SINGH, Pharmac. J. 109, 304 (1922)
- 6 W. WIECHULA, Dissertation Freie Universität Berlin 1955; G. SCHENCK, K.H. FRÖMMING, W. WIECHULA u. E. SCHWALB, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 293/65, 312 (1960)
- 7 E. SCHWALB, Dissertation Freie Universität Berlin 1959; G. SCHENCK, K.H. FRÖMMING, W. WIECHULA u. E. SCHWALB. Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 293/65, 312 (1960)
- 8 H.J. KLUGE, Dissertation Freie Universität Berlin 1962; K.H. FRÖMMING, G. SCHENCK u. H.J. KLUGE, Dtsch. Apotheker-Ztg. 102, 1276 (1962); G. SCHENCK, K.H. FRÖMMING u. H.J. KLUGE, Pharmaz. Ztg. 107, 1777 (1962)
- 9 H. SIMON, Dissertation Freie Universität Berlin 1963; K.H. FRÖMMING, G. SCHENCK u. H. SIMON, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 296/68, 557 (1963)
- 10 E. BAMANN u. K. MYRBÄCK, Methoden der Fermentforschung, Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941, 786
- 11 J.E. EASTOE, Biochemic. J. 61, 589-600 (1955)
- 12 O. FOLIN u. G. GIOCALTEU, J. biol. Chemistry 73, 629 (1927)
- 13 F. CRAMER, Papierchromatographie, 4. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1958, 149
- 14 H. AUTERHOFF, Lehrbuch d. Pharm. Chemie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H., Stuttgart 1962, 240
- 15 YUN-HSIAN YU, Acta pharmac. sinica 6, 101 (1958) ref.C. 132, 13273 (1961)

- 16 J. BOUGAULT, J. Pharmac. Chim. 15, 49 (1902)
- 17 W. AUTENRIETH u. K.H. BAUER, Die Auffindung d. Gifte, 6. Auflage, Verlag Steinkopff, Dresden 1943, 299
- 18 K.W. BENTLEY u. S.F. DYKE, J. chem. Soc. (London) 1959, 2575
- 19 G. BERTRAND u. V.J. MEYER, Ann. Chimie 17, 507 (1909)
- 20 B. CHOLLOT, L. CHAPON u. E. URION, Brauwiss. 15, 321-329 (1962) ref. C.A. 58, 5007a (1963)
- 21 B. BIEHL, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 119, 105 (1963)
- 22 H. MICHALEK u. L. SZARKOWSKA, Acta biochim. polon. 6, 399-409 (1959) ref. C. 132, 15788 (1961)
- 23 K.H. FRÖMMING, Habilitationsschrift Freie Universität Berlin 1960
- 24 F. KUBOWITZ, Biochem. Z. 292, 221 (1937)
- 25 F. KUBOWITZ, Biochem. Z. 299, 32 (1938)
- 26 E. BAMANN u. K. MYRBÄCK, Methoden der Fermentforschung, Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941, 987
- 27 M. GRAUBARD u. J.M. NELSON, J. biol. Chemistry 111, 757 (1935)
- 28 Chromatographie, S. 136; herausgegeben von E. Merck AG, Darmstadt
- 29 O. HESSE, Liebigs Ann. Chem. 222, 238 (1884)
- 30 K. POLSTORFF, Ber. dtsh. chem. Ges. 13, 86 (1880)
- 31 E. BESTHORN, Ber. dtsh. chem. Ges. 43, 1524 (1910)
- 32 S. HÜNIG u. Mitarbeiter, Angew. Chemie 70, 215 (1958)
- 33 T.M. DEVLIN, zit. in Methods in Encymol. 2, 770 (1955)
- 34 B. CHANCE, Advances in Encymol. 12, 153 (1951)
- 35 Hagers Handbuch d. Pharm. Praxis, 2. Ergänzungsband, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958, 516
- 36 M. ROLLAND u. S. LISSITZKY, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 56, 83 (1962)
- 37 H.S. RAPER, Physic. Rev. 8, 245 (1928)
- 38 H.S. RAPER, Ergebn. Enzymforsch. 1, 270 (1932)
- 39 H.S. MASON, J. biol. Chemistry 172, 83 (1948)
- 40 K. FREUDENBERG, Nature 183, 1152 (1959)

Lebenslauf

Am 23. Juni 1934 wurde ich, Heinz-Günter Friedrich Schneller, als Sohn des Ingenieurs Friedrich Schneller und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Hofmann in Berlin geboren.

Von 1940 bis 1944 besuchte ich die Volksschule und kam anschließend in die Askanische Oberschule in Berlin. Nach der Reifeprüfung im März 1953 trat ich am 1. April 1953 in die St. Georg Apotheke in Berlin als Praktikant ein.

Im März 1955 legte ich die pharmazeutische Vorprüfung ab und studierte dann ab Mai desselben Jahres sechs Semester Pharmazie an der Freien Universität Berlin. Im Mai 1958 bestand ich die pharmazeutische Prüfung. Nach anschließender zweijähriger praktischer Tätigkeit in verschiedenen Apotheken Berlins begann ich unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. K.H. Frömming mit meiner Doktorarbeit am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin. Dort war ich erst als Famulus und ab 15. Oktober 1961 als wissenschaftlicher Assistent tätig.

Xerografi-Druck :
Chemoprint OHG
Gießen